



# Modification de la biodisponibilité orale des médicaments : interactions “ Herb-Drugs ” “ Drugs-Drugs”.

Flore Marques Dossou-Yovo

## ► To cite this version:

Flore Marques Dossou-Yovo. Modification de la biodisponibilité orale des médicaments : interactions “ Herb-Drugs ” “ Drugs- Drugs”.. Médecine humaine et pathologie. Conservatoire national des arts et métiers - CNAM, 2014. Français. NNT : 2014CNAM0936 . tel-01169633

**HAL Id: tel-01169633**

**<https://theses.hal.science/tel-01169633>**

Submitted on 2 Nov 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**ÉCOLE DOCTORALE [ED 415/ Abbé Grégoire]**  
**BIOLOGIE - BIOTECHNOLOGIE**

# THÈSE

Confidentiel

Présentée par:

**Flore DOSSOU-YOVO**

Soutenue le: **31 Janvier 2014**

Pour obtenir le grade de:

**Docteur du Conservatoire National des Arts et Métiers**

Discipline/ Spécialité:

**BIOLOGIE / SCIENCES ET TECHNIQUES DU VIVANT**

**Modification de la Biodisponibilité orale des médicaments:  
Interactions « Herb-Drugs » « Drugs- Drugs »**

**DIRECTION:**

Directeur : **M. POCHART Philippe**, Professeur des Universités, CNAM Paris

Co-directeur : **M. ETO Bruno** Directeur des Laboratoires TBC. Fac. Médecine X. Bichat Paris VII

**RAPPORTEURS:**

**Me. KOTELEVETS Larissa**, Inserm, U1149, ERL CNRS Faculté de Médecine X. Bichat Paris VII

**M. HOUNTONDI Codjo**, Professeur des Universités, ER-UPMC Université Pierre et Marie Curie Paris VI

**MEMBRES DU JURY:**

**M. PONCHEL Gilles**, Professeur des Universités, UMR 8612 Faculté de pharmacie Chatenay-Malabry

**M. ZAGURY François**, Professeur des Universités, CNAM Paris.

# **Modification de la Biodisponibilité orale des médicaments: interactions « Herb-Drugs » « Drugs-Drugs »**

**Flore DOSSOU-YOVO  
CNAM**

---

# TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	5
RÉSUMÉ.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTE DES TABLEAUX .....	8
LISTE DES FIGURES .....	9
ABREVIATIONS .....	11
PREAMBULE.....	14
PARTIE I: CONTEXTE ET ETAT DE LA QUESTION.....	15
CHAPITRE I: .....	16
L'ÉPITHELIUM INTESTINAL ET SON ANATOMIE FONCTIONNELLE.....	16
I. La Physiologie de l'intestin .....	16
1.1. Les différents segments de l'intestin .....	16
1.2. La description histologique de l'intestin.....	19
1.2.1. La structure des différentes couches .....	19
1.2.2.2. Les différentes cellules constitutives de l'épithélium.....	22
1.2.2.1. Les cellules constitutives des villosités.....	22
1.2.2.2. Les cellules constitutives des cryptes.....	25
1.2.2.3. Autres cellules intervenant dans la fonction de barrière .....	26
II. Les propriétés fonctionnelles des différentes couches .....	27
CHAPITRE 2: .....	29
LA PERMEABILITE INTESTINALE .....	29
I. Les bases fondamentales d'évaluation du passage intestinal .....	29
1.1. Les différents itinéraires et mécanismes de transport des xénobiotiques et ou leurs métabolites .....	29
1.2. Quels sont les itinéraires empruntés par les xénobiotiques? .....	29
1.2. Les différents mécanismes d'action .....	30
2. Les barrières physiologiques: éléments déterminant du passage.....	31
2.1. Les Barrières physiques .....	32
2.1.1. La couche d'eau non agitée .....	32
2.1.2. Le mucus: origine, composition, structure, fonctions et propriétés.....	32
2.1.2.1. Origine et localisation.....	32
2.1.2.2. La composition et la technostucture du mucus .....	34
2.1.3. La membrane plasmique: sa structure et ses fonctions.....	45
2.1.3.1. Les Protéines membranaires de transport .....	47
2.1.3.2. Les jonctions intercellulaires .....	48
2.1.3.4. Les jonctions d'ancrage ( <i>anchoring junctions</i> ) .....	49
2.1.3.5. Les canaux ioniques .....	51
2.2. Les barrières biochimiques : les enzymes et les pompes .....	51
2.2.1. Les enzymes.....	51
2.2.2. Les pompes ATP-ases et les canaux.....	52
1.3. La notion de flux et de perméabilité membranaire .....	53
II. Les facteurs qui influencent l'absorption intestinale et/ou la biodisponibilité orale.....	56
2.1. La concentration du xénobiotique ou du médicament.....	56
2.1.1. La couche d'eau non agitée (UWL) .....	57
2.1.2. La membrane plasmique et ses composantes .....	59
2.1.3. Les interactions médicamenteuses .....	60
2.1.3.1. Les interactions entre médicaments «drug-drug».....	61
2.1.3.2. Les interactions plantes médicaments «herb-drug».....	61
III. Les différents modèles et techniques de mesures de la perméabilité intestinale .....	63



3.1. Les méthodes de mesure de la diffusion à travers la muqueuse .....	63
3.1.1. <i>In vivo</i> .....	63
3.1.1.1. La perfusion intestinale .....	63
3.1.1.2. <i>In vivo</i> et <i>in situ</i> : l'anse isolée .....	63
3.1.1.3. <i>In vitro</i> .....	64
3.1.1.4. Les chambres d'Ussing.....	66
PARTIE 2: .....	70
HYPOTHESES ET OBJECTIFS.....	70
I. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS .....	71
1.1. Problématique.....	71
1.2. Hypothèse de travail .....	72
1.3. Objectifs du travail .....	72
PARTIE 3: TRAVAIL EXPERIMENTAL .....	73
BREVET N°: FR1300921.....	74
PUBLICATION N°1 .....	89
PUBLICATION N°2 .....	100
PARTIE 4: DISCUSSION GENERALE.....	108
DISCUSSION.....	109
PARTIE 5: CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....	114
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	115
PARTIE 6: RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	116
REFERENCES .....	117

## REMERCIEMENTS

*Ce travail a été réalisé au Conservatoire National des Arts et Métiers (CNAM), dans l'École des Sciences Industrielles et technologies de l'information (SITI) dans le département de Chimie Alimentation-Santé- Environnement-Risque (CASER) au sein du Laboratoire de Biologie et de biotechnologie, et en collaboration avec le Laboratoire de Biotechnologie TBC TransCell-Lab de la Faculté de Médecine Xavier Bichat Paris VII, et avec l'UMR CNRS 8612 de la faculté de pharmacie de Chatenay-Malabry Paris XI.*

*Cette thèse a été en partie financée par le CNAM, mais aussi par le Laboratoire TBC TransCell-Lab et l'UMR CNRS 8612. Les chambres de perméation d'USSING ont été mises à disposition par TBC-Biomécatronics SAS. L'institut Galien de la faculté de Pharmacie de Chatenay- Malabry a pris en charge les médicaments anticancéreux et mis à disposition le matériel et les conditions sécuritaires nécessaires pour la manipulation de ces produits. Je leur en suis très reconnaissante.*

*Je remercie Mr Philippe POCHART Professeur au CNAM qui a eu l'idée de me permettre de faire une thèse. Je tiens particulièrement à remercier Monsieur le Professeur Gilles PONCHEL à l'institut Galien Paris Sud- UMR CNRS 8612 pour son assistance, ses déplacements, ses conseils, son soutien malgré sa charge de travail.*

*Je souhaiterais adresser ma profonde reconnaissance au Professeur associé Bruno ETO directeur du laboratoire TBC TransCell-Lab, qui m'a toujours fait confiance, et pour avoir mis en œuvre pendant ces années son ingéniosité, son savoir-faire, son laboratoire, son matériel et son personnel afin que je puisse concrétiser ce travail. J'en profite pour remercier ses collaborateurs le Mr Godefroy MAMADOU et le Dr Nicolas LIMAS-NZOUZI, de leur aide et partage si précieux qui bien des fois m'ont motivé et assisté pour la réalisation de longues journées de travail avec les chambres d'Ussing. Merci pour les histoires pleines d'humour et ces rires qui détendent.*

*Un grand Merci pour mon accueil par le personnel du laboratoire Analyse Chimique et Bio-Analyse du CNAM et en particulier pour l'assistance et l'aide technique précieuse de Mr Patrick BOUTIN et de Mme Pétronille AGBO en ce qui concerne l'usage de certains appareils de dosages.*

*Qu'il me soit permis de remercier le Directeur de l'école doctorale le Professeur Antoine BEVORT, la Directrice de la Recherche, le Professeur Clotilde FERROUD, le Directeur de l'École SITI le Professeur William DAB, la Directrice du Département Madame Marie Debacq-PASSAT et tous ceux et celles du CNAM qui de près ou de loin ont œuvré pour que la mission première du Cnam soit accomplie en permettant la reconnaissance de ses travaux.*

*J'exprime toute ma gratitude à Mme Larissa KOTELEVETS, au Professeur Codjo HOUNTONDJI qui m'ont fait l'honneur d'avoir accepté juger ce travail et d'en être les rapporteurs.*

*Je ne pourrai ne pas mentionner mes vifs remerciements à mon père au chevet de qui je n'ai pas pu être lors de son départ de ce monde mais avec qui j'ai pu longuement m'entretenir par téléphone pour la bénédiction de mes travaux. Je ne saurai terminer sans avoir de vives pensées à Mme Giovanna BRUNET ex-directrice de l'hôpital Ste Camille, à ma marraine Mme Y.GAONA, à Mamy, à mes amis(es), mes enfants et surtout mon époux, qui ont tous cru en moi et n'ont cessé de m'encourager et de me soutenir. Je les remercie pour leur patience et surtout pour avoir pu s'organiser pendant mes longs moments d'absence. Cette thèse leur est dédiée.*

## RÉSUMÉ

L'administration par voie orale des médicaments reste encore de nos jours la voie royale de la prise des médicaments car moins onéreuse et plus adaptée au confort du patient. Mais cette voie reste toujours inaccessible pour certains médicaments comme les médicaments biologiques et les biosimilaires voir certains anticancéreux et antirétroviraux.

Le but de ce travail est d'améliorer la biodisponibilité par voie orale des médicaments à faible biodisponibilité par la mise au point d'un promoteur d'absorption. Pour y arriver nous avons adopté comme stratégie de développer un promoteur qui agit à la fois sur le passage passif et sur le passage actif des médicaments. Les études *in vitro* ont été réalisées en chambre de perméation d'Ussing adaptées par la société Biomécatronics SAS (Béthune France).

Dans la première partie de ce travail (*Brevet*), nous avons montré que l'utilisation d'une composition pharmaceutique et/ou diététique comprenant un extrait de plante (*Hibiscus sabdariffa*) pouvait augmenter la biodisponibilité *in vitro* des médicaments et des xénobiotiques qui passent par la voie paracellulaire comme le cisplatine (21 fois), l'oxaliplatine (11 fois), la fluorescéine isothiocyanate-Dextran 4000 (3 fois), mais également les médicaments connus pour leur transport actif par la voie transcellulaire comme l'Efavirenz (7 fois) et l'Atazanavir (4 fois).

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons cherché à vérifier si notre promoteur d'absorption des médicaments a un effet sur la couche de mucus intestinale. Cette couche peut être un facteur limitant de passage des médicaments au travers de la barrière intestinale.

Dans un premier temps (*article 1*), nous avons induit l'augmentation de la couche mucus au niveau du colon de rat après un prétraitement pendant une semaine avec le métronidazole. Puis nous avons confirmé (*article 2*) que l'administration par voie orale de deux antibiotiques le Cotrimoxazole (CTX) et le métronidazole (MTZ) pendant une semaine augmente la couche de mucus au niveau du côlon ; aussi nous avons montré qu'il existe une relation entre l'augmentation de la couche de mucus et la diminution de la conductance qui est l'index de transport passif des ions, des électrolytes et de certaines molécules à faibles poids moléculaires.

De plus l'augmentation de la couche de mucus au niveau de l'intestin est responsable de la diminution du passage transépithélial des deux antirétroviraux dont l'utilisation est recommandée en première ligne par l'OMS (le Ritonavir et l'Atazanavir) sur les sujets porteurs du VIH (virus de l'immunodéficience humaine). Après les traitements au MTZ et au CTX la sécrétion de l'Atazanavir augmente respectivement dans le côlon proximal de 2 et 4 fois et dans le côlon distal de 3 et 5 fois. On obtient également une sécrétion du Ritonavir de 5 et 10 fois dans le proximal et de 2 et 5 fois plus dans le distal.

Le travail se poursuit par l'étude de l'effet de notre promoteur d'absorption des médicaments sur la couche de mucus intestinal.

En conclusion, ce travail montre que l'on peut augmenter la biodisponibilité *in vitro* en utilisant les promoteurs de l'absorption des xénobiotiques qui agissent à la fois au niveau du transport passif et actif.

**Mots clés :** Biodisponibilité, épithélium intestinal, perméabilité intestinale, transport de médicaments, promoteur d'absorption, antibiotiques, anticancéreux, antirétroviraux, rat, côlon, mucus, chambre d'Ussing.

## ABSTRACT

Oral dosing is still seen as the silver bullet of drug administration, as it is cheaper and better adapted to patient comfort. However, oral route is still inaccessible to many drugs such as biologics and biosimilars respectively certain anticancer drugs and antiretrovirals (ARV).

The aim of this present study was to find new drugs enhancers that improve the oral bioavailability of drugs and xenobiotics. All the studies were realized *in vitro* using Ussing chambers technic. To achieve the set objective we used the strategy to develop drug enhancer which can modulate at the same time transcellular and paracellular pathways.

In the first part of this study (*patent*) we have shown that the use of a pharmaceutical and / or a dietetic formulation containing a plant extract (*Hibiscus sabdariffa*) could increase the bioavailability *in vitro* in rats not only of cisplatin (21 fold), oxaliplatin (11 fold) and Fluorescein Isothiocyanate-Dextran 4000 (FD4, 3 fold). All that drugs were transported through intestinal barrier using paracellular pathway. In addition the study showed that this formulated enhancer can increased the bioavailability of Efavirenz (7 fold) and Atazanavir (4 fold) which are active transported.

In order to assess the effect of new drugs enhancer on mucus thickness that limits the transport of xenobiotic through intestinal barrier, we decide to evaluate his effect on passive and active transport of drugs.

In the second part of this study we have shown that after a week of pre-treatment of rats with Metronidazole (MTZ, publication 1) and Cotrimoxazole (CTX, publication 2), the two most commonly used antibiotics in the prophylaxis against opportunistic infections in HIV / AIDS, both increase colonic mucus thickness that affect directly passive intestinal permeability by reducing conductance an index of passive transport through intestinal epithelium. In addition those antibiotics also entail a change in the transepithelial conductance and ARV fluxes. After MTZ and CTX treatment the secretion of Atazanavir (ATZ) increases respectively in the proximal colon by 2 to 4 fold and in the distal colon by 3 to 5 fold respectively. Ritonavir (RTV) is poorly absorbed in control, after a week of pre-treatment with MTZ and CTX one rather notices a secretion of RTV 5 to 10 fold higher in the proximal and 2 to 5 fold higher in the distal colon. The next study will be conducted to evaluate the effect of new drugs enhancer on mucus thickness layer.

In conclusion, oral bioavailability of drugs and xenobiotics can be enhanced by pharmaceutical composition that contains herbal extract which increase passive and active transport of drugs through intestinal barrier.

**Keywords:** intestinal bioavailability, intestinal epithelium, intestinal permeability, drugs transport, drugs enhancers, antibiotic, anticancer drugs, antiretroviral, rat, colon, mucus, Ussing chamber.

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1:</b>	Sites d'expression des mucines secrétées ou membranaires et des antigènes antimicrobiens du TGI.....	40
<b>Tableau 2:</b>	Interactions « Herb-Drug » et effets cliniques.....	62

# LISTE DES FIGURES

Figure 1:	Organisation de l'intestin humain selon l'axe gastro-colique. <i>Martzolff R. Encyclopédie Médicale Vulgaris. /index.php/2007/07.....</i>	17
Figure 2:	Anatomie viscérale abdominale du rat. <i>Marc Aprahamian -AFSTAL Strasbourg France 2004).....</i>	18
Figure 3:	Vue en trois dimensions indiquant diverses couches et structures annexes des différentes sections du tube digestif (TORTORA & GRABOWSKI Principe d'Anatomie et de physiologie 2ième éd. De BOECK Université).....	19
Figure 4:	Jéjunum de Lapin - Coupe histologique – Coloration H.E.S (CNAM - Laboratoire de Biologie Flore Dossou-yovo - photo personnelle).....	20
Figure 5:	Côlon de Lapin - Coupe histologique – Coloration H.E.S. (CNAM - Laboratoire de Biologie Flore Dossou-yovo - photo personnelle).....	20
Figure 6:	Coupe de l'intestin grêle montrant les chylifères et les vaisseaux sanguins du chorion (TORTORA & GRABOWSKI Principe d'Anatomie et de physiologie 2ième éd. De BOECK Université 1994).....	21
Figure 7A:	La disposition des types de cellules épithéliales de l'intestin grêle chez les mammifères: <i>Crosnier et al. 2006.....</i>	23
Figure 7B:	Coupe de jéjunum de souris avec forte sécrétion de mucus ; présence de cellules à mucus se déversant dans la lumière. Coloration HES fort grossissement au microscope à épi-fluorescence. (Photo personnelle Flore Dossou-yovo).....	24
Figure 7C:	Schéma des éléments formant le tissu lymphoïde intestinal. Ramiro-Puig, E., et al., <i>The bowel: a key component of the immune system</i> . Rev Esp Enferm Dig, 2008. 100(1): p. 29-34.....	26
Figure 8:	Voies et mécanismes du transport des molécules à travers l'épithélium intestinal. <i>D'après une publication du Centre européen pour la validation des méthodes substitutives (European Centre for Validation of Alternative Methods – ECVAM). E. Le Ferrec et al. (2001).....</i>	31
Figure 9:	Schéma montrant l'épaisseur des deux couches de mucus au niveau du corpus, de l'antré, du milieu du duodénum, du jéjunum proximal, de l'iléum distal, et du côlon proximal du tube digestif du rat. <i>Atuma, C., et al., 2001.....</i>	34
Figure 10:	Résumé de la structure biochimique des mucines présentées avec trois différents grossissements (schéma modifié de Cone et al. 2009).....	36
Figure 11:	FIGURE 11 A, B, C Sécrétion, Synthèse et Polymérisation des Mucines (McGucking 2011).....	38-39
Figure 12:	Hybridation in situ sur coupe de caecum de rat. (Flore Dossou-yovo).....	41
Figure 13:	Mucines membranaires et protection cellulaire. (Porchet et al. 2004).....	43
Figure 14A:	Protéines membranaires de transport (Purves et al. 2000).....	46

Figure 14B:	Protéines membranaires de transport ( <i>Purves et al. 2000</i> ) <i>Traité de biologie - Le monde du vivant. W.K. Purves and al. Medecines Sciences Flammarion ed. 2000</i> .....	46
Figure 15:	Structure moléculaire de la jonction intercellulaire des cellules épithéliales de l'intestin. ( <i>Takuya Suzuki 2013</i> ).....	48
Figure 16:	Les Voies de signalisation et de modulation des jonctions serrées: rôle de la phospholipase C. ( <i>Ward P. et al. 2000</i> ).....	50
Figure 17:	Schéma de perméation d'un médicament en fonction de la concentration. Trajet à partir de la phase donneur en passant par les couches d'UWL de part et d'autre de la membrane, jusqu'à la phase du côté récepteur. Loftsson, 2007.....	55
Figure 19:	Schéma du Principe de chambre de perméation d'Ussing. ( <i>Eto Bruno, 2010</i> ).....	67

## ABREVIATIONS

BA/PAS:	Bleu Alcian / Periodic acid Schiffs
ABC:	ATP binding cassette
ADN:	Acide désoxyribonucléase
ARV:	Antirétroviral
ATV:	Atazanavir
BA:	Bioavaibility
BCRP:	Breast cancer resistance
BCS:	Biopharmaceutic classification system
BSA:	Bovine serum albumin
CAC:	Chimiothérapie alternative combinatoire
CD4:	Cluster of differentiation 4
CFTR:	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CIS:	Cisplatine
CK:	Cystein knot
CTL:	Contrôle
CTX:	Cotrimoxazole
CYP :	Cytochrome P
DAG:	Diacylglycérol
DMSO:	Diméthyl sulfoxyde
DSS:	Dextran sodium sulfate
DTCs:	Drugs and therapeutics committees
EDTA:	Ethylène diamine tétraacétique
EFV:	Efavirenz
EMA:	European medicines agency
FAE:	Follicule associated epithelium
FCGBP:	Fc-gamma binding protein
FD4:	Fluorescéine Isothiocyanate Dextran 4000
FLAT:	Formations lymphoid associés au tube digestif
GALT:	Gut associated lymphoid Tissue
GLUT:	Glucose transporter
Gt:	trans-epithelial electrical conductance
HAART:	Highly active antiretroviral therapy
HAAT:	Highly active antibiotic pre-treatment
HGNC:	Hugo gene nomenclature committee
HIV:	Human immunodeficiency virus
HPT1:	Human peptide transporter
HUGO:	Human genome organization



IBMX:	3-isobutyl1 méthylxantine
IEL:	Intra epithelial lymphocyte
IgA:	Immunoglobulin A
IgG:	Immunoglobulin G
IgM:	Immunoglobulin M
INNTI:	Inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase reverse
INTI:	Inhibiteur nucléosidique de la transcriptase reverse
IP (PI):	Inhibiteur de protéase
Isc :	Short-circuit current
JAMs	Junctional adhesion molecule
LPC:	Lyso-phosphatidylcholine
LPL:	Lamina propria Lymphocytes
M cell:	Microfold cell
M:	Mucus
MDR:	Multidrug resistance
MLCK	Myosin light chain Kinase
MRP2:	Multidrug resistance protein
MT:	Mucus Thicknes (layer)
MTZ:	Métronidazole
MUC:	Mucine
NHERF:	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Exchange Regulator Factor
OAPI:	Organisation africaine de la propriété intellectuelle.
OATP:	Organic anions Transporter
OCTN:	Organic cations transporters
OMS (WHO):	Organisation mondiale de la santé (world Health Organization)
OXA:	Oxaliplatine
PC:	Phosphatidylcholine
PE:	Phosphatidylethanolamine
PEPT1:	Peptide transporter
PG:	Phosphatidylglycerol
P-gp:	P-glycoprotein
PHT1:	Peptide/Histidine Transporter
PI:	Phosphatidylglycerol
PIP2:	Phosphatidyl-inositol (4-5) biphosphate
Pj:	<i>Pneumocystis jiroveci</i>
PKC:	Protéine kinase C
PLC:	Phospholipase C
PS:	Phosphatidylserine
PTS:	Proline théonine Sérine

RCH:	Rectocolite Hémorragique
REGIIIa:	Regenerating islet-derived protein
RELMβ:	Resistin-like molecule peptide transporter β
RTKs:	Receptors Tyrosine kinase
RTV:	Ritonavir
SEA domain:	Sea-urchin sperm protein enterokinase and agrin
SGLT:	Sodium glucose transporteur
SM:	Séreux-muqueux
SQV:	Saquinavir
TEER:	Transepithelial electric resistance
TFF:	Trefoil Factor Family
Tg:	<i>Toxoplasma gondii</i>
TGI:	Tract gastrointestinal
TJAP:	Tight junctions-associated
TLR:	Toll-like receptor family
TNFα:	Tumor necrosis factor
TR:	Tandem Repeat amino acid sequence
UWL :	Unstirred water layer
VIH/SIDA Acquise	Virus de l'immuno déficience Humain/Syndrome d'Immuno Déficience
VNTR:	Variable number of tandem repeat
ZO:	Zona Occludens

## Préambule

Ce travail se situe dans le cadre général de la recherche de promoteurs de l'absorption intestinale des médicaments à faible biodisponibilité par voie orale et plus particulièrement les anticancéreux et les antirétroviraux.

La biodisponibilité orale des médicaments dépend essentiellement de deux facteurs principaux: la concentration du produit soluble dans le milieu aqueux (solubilité du principe actif) et la perméabilité au travers de la barrière intestinale.

La concentration du principe actif disponible au niveau de l'intestin dépend de plusieurs facteurs dont la solubilité du principe actif qui peut lui même dépendre du polymorphisme cristallin.

La perméabilité du principe actif au travers de la barrière intestinale peut se faire par un transport actif ou passif. Chaque type de transport pouvant être modifié par la présence d'éléments constitutifs tels que les « protéines transporteurs » (Pgp) et les enzymes membranaires (cytochromes P450).

Dans ce travail, nous présentons sous forme de bibliographie les facteurs les plus connus qui peuvent contribuer à modifier la biodisponibilité par voie orale des médicaments. Nous nous sommes focalisés sur la modification de la biodisponibilité par voie orale des médicaments suite à des interactions médicamenteuses «drug-drug» et «herb-drug». Ces interactions peuvent être directes ou au travers de la modification de l'environnement et/ou de la morphologie intestinale.

Dans la première partie de ce travail, nous avons montré qu'une interaction «herb-drug» peut augmenter la perméabilité orale des médicaments à faible biodisponibilité telles les anticancéreux (cisplatine et oxaliplatine) et les antirétroviraux (Efavirenz et Atazanavir).

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons montré que l'administration chronique des antibiotiques comme le Métronidazole et le Cotrimoxazole, largement utilisés en clinique dans la prophylaxie des maladies opportunistes au VIH/SIDA réduisait la biodisponibilité par voie orale des antirétroviraux surtout ceux qui sont recommandés en première intention par l'organisation mondiale de la santé. Ces résultats pourraient en partie expliquer les résistances observées chez les patients ayant reçus en prophylaxie des antibiotiques pendant la période du non éligibilité aux ARVs.

## **PARTIE I: CONTEXTE ET ETAT DE LA QUESTION**

# **Chapitre I:**

## **L'épithélium intestinal et son anatomie fonctionnelle**

### **I. La Physiologie de l'intestin**

#### **1.1. Les différents segments de l'intestin**

Le tractus gastro-intestinal communément appelé tube digestif, représente un ensemble d'organes servant d'interface entre l'intérieur de l'organisme et le milieu extérieur environnant. Il comporte la cavité buccale, l'œsophage, l'estomac, l'intestin ainsi que les glandes annexes (foie et pancréas).

L'intestin a pour rôle de digérer, d'absorber et de transporter sélectivement les nutriments, les vitamines, les cofacteurs essentiels, et les déchets, mais il constitue également une barrière efficace contre la pénétration de substances toxiques intraluminales telles que les bactéries, les antigènes, les additifs alimentaires etc.

Il est caractérisé par une orientation selon deux axes: L'axe longitudinal (gastro-colique) qui permet de différencier les segments intestinaux, L'axe transversal (crypto-villositaire) qui révèle les différentes couches tissulaires constituées d'une diversité de cellules qui les composent.

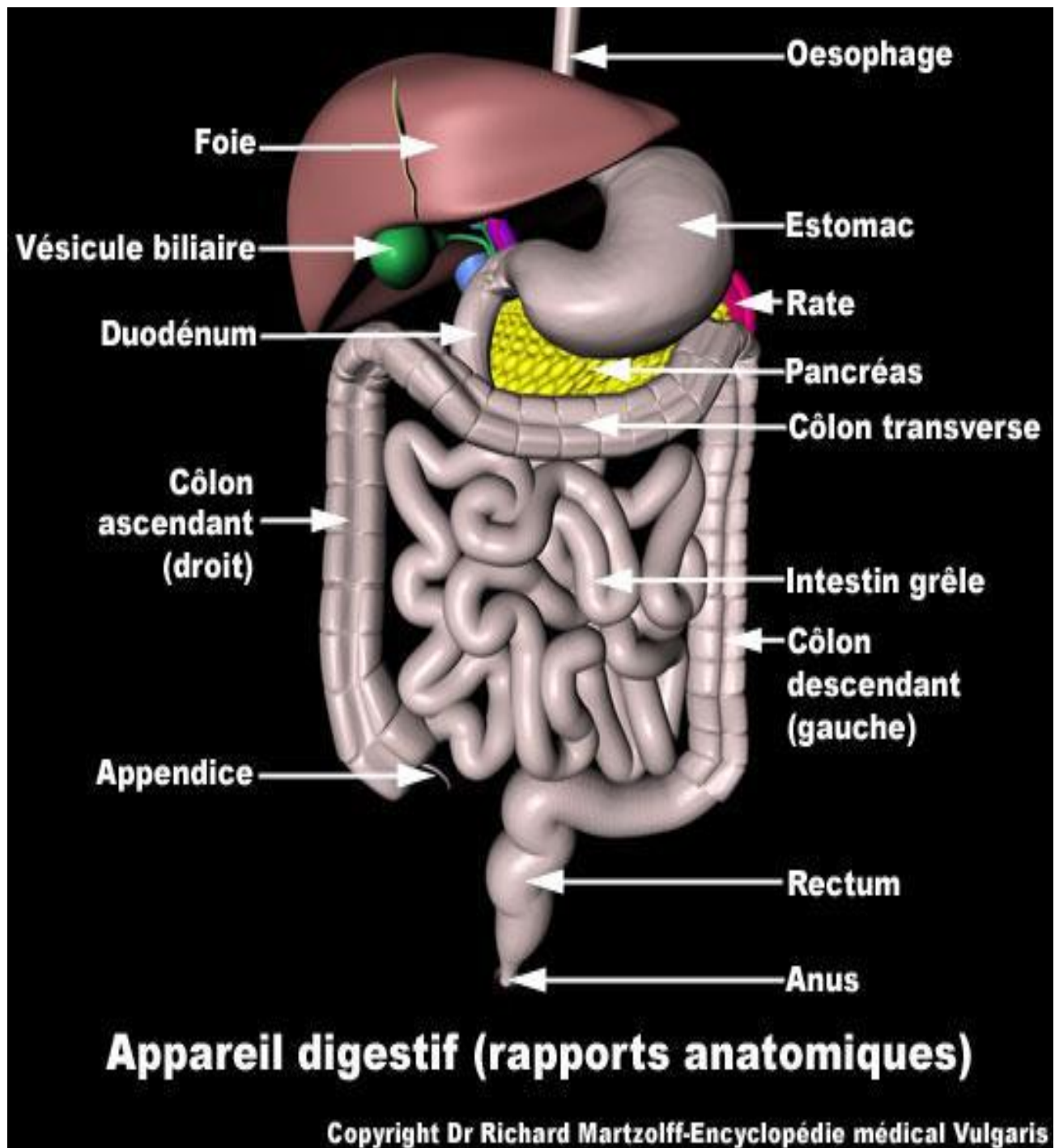
Cette organisation selon l'axe gastro-colique est la suivante : l'intestin grêle et le gros intestin (côlon, Figure 1).

Le grêle, rattaché à l'estomac par le pylore est la partie la plus étendue de l'intestin ; Il mesure environ 4 à 7 mètres chez l'homme selon la technique de mesure National Cancer institut - [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov).et en moyenne 30 cm chez le rat (non sevré) Suivant cet axe longitudinal, il est subdivisé en trois segments :

- le duodénum, le plus court, en aval du sphincter pylorique,
- le jéjunum qui lui fait suite, porte de nombreux replis ou valvules conniventes
- l'iléon, le segment distal, s'achève dans sa portion terminale par une valvule iléo-caecale, qui permet la communication avec le cæcum (partie initiale du côlon).

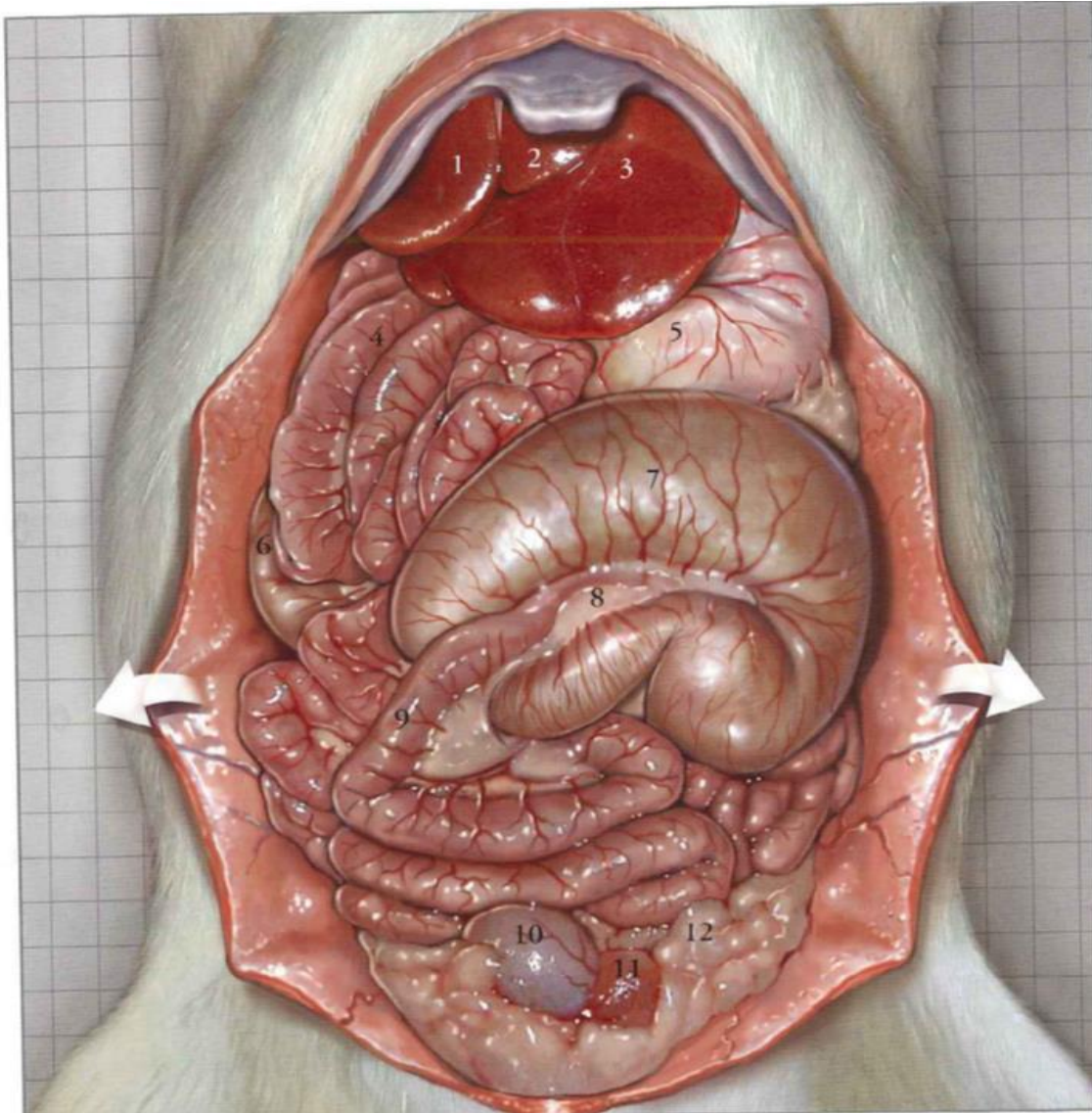
Chez l'homme, chacune de ces différents segments: duodénum, jéjunum et iléon fait respectivement 5%, 50%, 45% de la longueur totale du grêle. Le gros intestin ou côlon, plus large et moins long que le grêle, mesure environ 1,5 m de long pour 8 cm de diamètre chez l'homme et environ 15 à 17cm en moyenne chez le rat sain âgé de 5 à 6 semaines (données expérimentales non publiées). Dans la cavité

abdominale sa disposition lui confère les noms de côlon proximal, transverse, distal et sigmoïde (Figure 1).



**FIGURE 1-** Organisation de l'intestin humain selon l'axe gastro-colique.  
Martzloff R. Encyclopédie Médicale Vulgaris. <http://video.vulgaris-medical.com/index.php/2007/07>

Chez les rongeurs, on observe un cæcum plus volumineux que chez l'homme, (Figure 2). Le côlon se termine par le rectum qui s'ouvre sur l'extérieur par l'anus. Une étude plus affinée de ces segments nous révèle une architecture plus complexe de l'intestin selon l'axe transversal (crypto-villositaire). Nous aborderons les détails dans le point suivant.



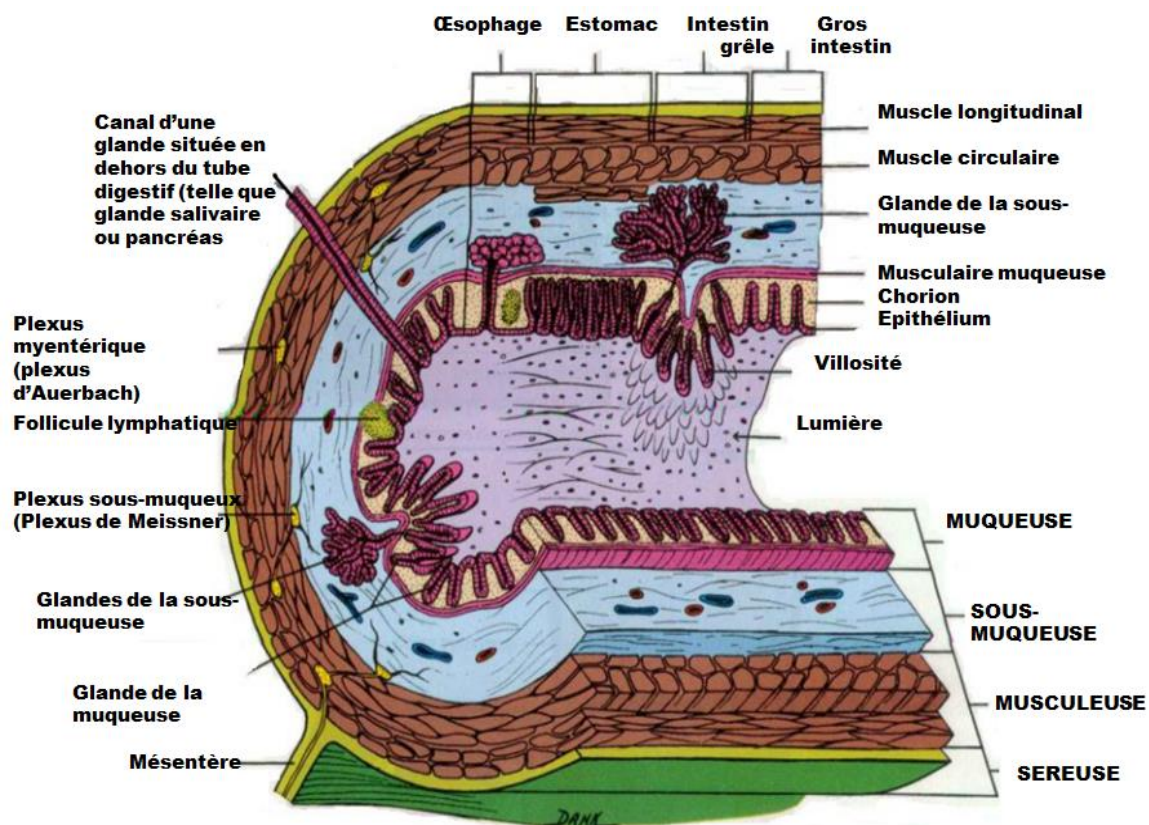
**Figure 2 - Anatomie viscérale abdominale du rat** (Marc Aprahamian -AFSTAL Strasbourg France 2004). 1- Lobe droit médial du foie (*lobus hepatis dexter medialis*), 2.- Lobe gauche médial du foie (*lobus hepatis sinister medialis*), 3- Lobe gauche latéral du foie (*lobus hepatis sinister lateralis*), 4-Jéjunum (*jejunum*), 5- Corps de l'estomac (*corpus ventriculi*), 6- côlon ascendant (*côlon ascendens*), 7-Caecum (*caecum*), 8- Valvule iléocaecale (*valva ileocaecalis*), 9- Iléon (*Ileum*), 10- Vessie Urinaire (*vesica urinaria*), 11- Prostate (*prostata*), 12.- Graisse paravésicale (*corpus adiposum paravésicalis*)



## 1.2. La description histologique de l'intestin

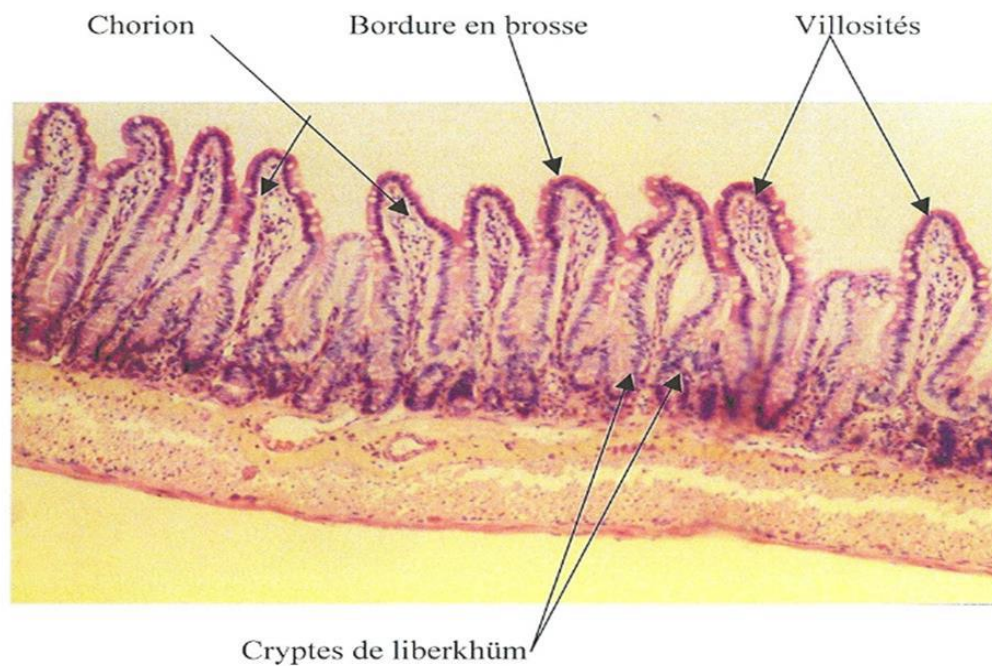
### 1.2.1. La structure des différentes couches

Dans l'organisation transversale pariétale (axe crypto-villositaire) de l'intestin, l'épithélium en contact avec le contenu de la lumière intestinale, impliqué en priorité dans l'absorption est suivi en profondeur de différentes couches successives. Les deux premières couches, la muqueuse et la sous-muqueuse forment un nombre considérable de replis disposés de façon circulaire au pourtour de la lumière : les valvules conniventes. Celles-ci sont plus marquées dans le jéjunum et disparaissent de la partie distale du grêle. L'accroissement de la surface d'échanges et d'absorption est assuré par les valvules conniventes ou valvules de Kerckring, qui forment d'autres replis plus serrés à l'aspect velouté que sont les villosités, les cellules épithéliales étant elles-mêmes recouvertes de microvillosités (surface d'environ 250 m<sup>2</sup>)

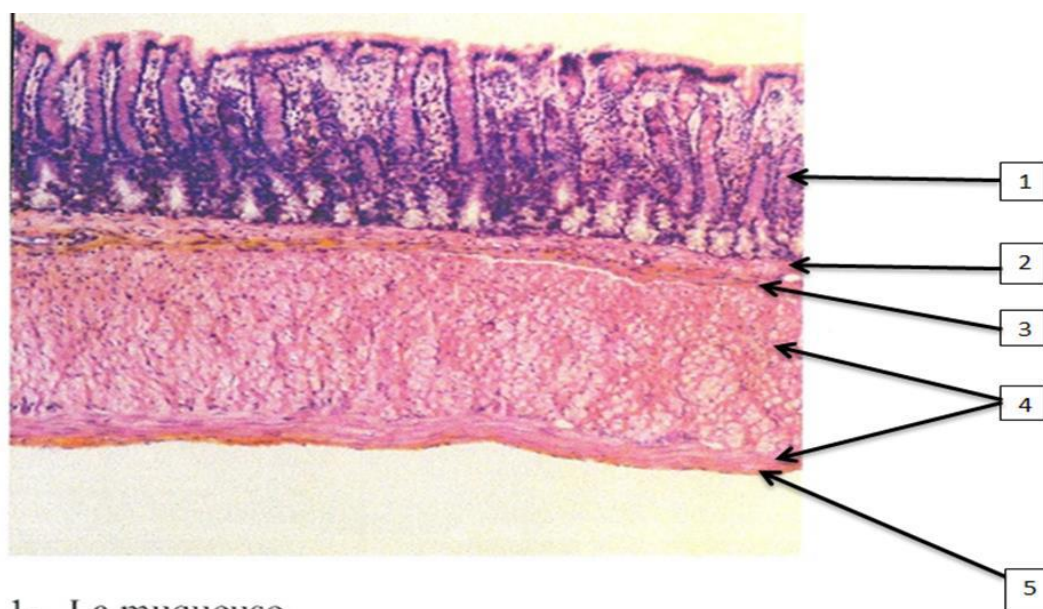


**Figure 3** Vue en trois dimensions indiquant diverses couches et structures annexes des différentes sections du tube digestif (TORTORA & GRABOWSKI Principe d'Anatomie et de physiologie 2<sup>ème</sup> éd. De BOECK Université)



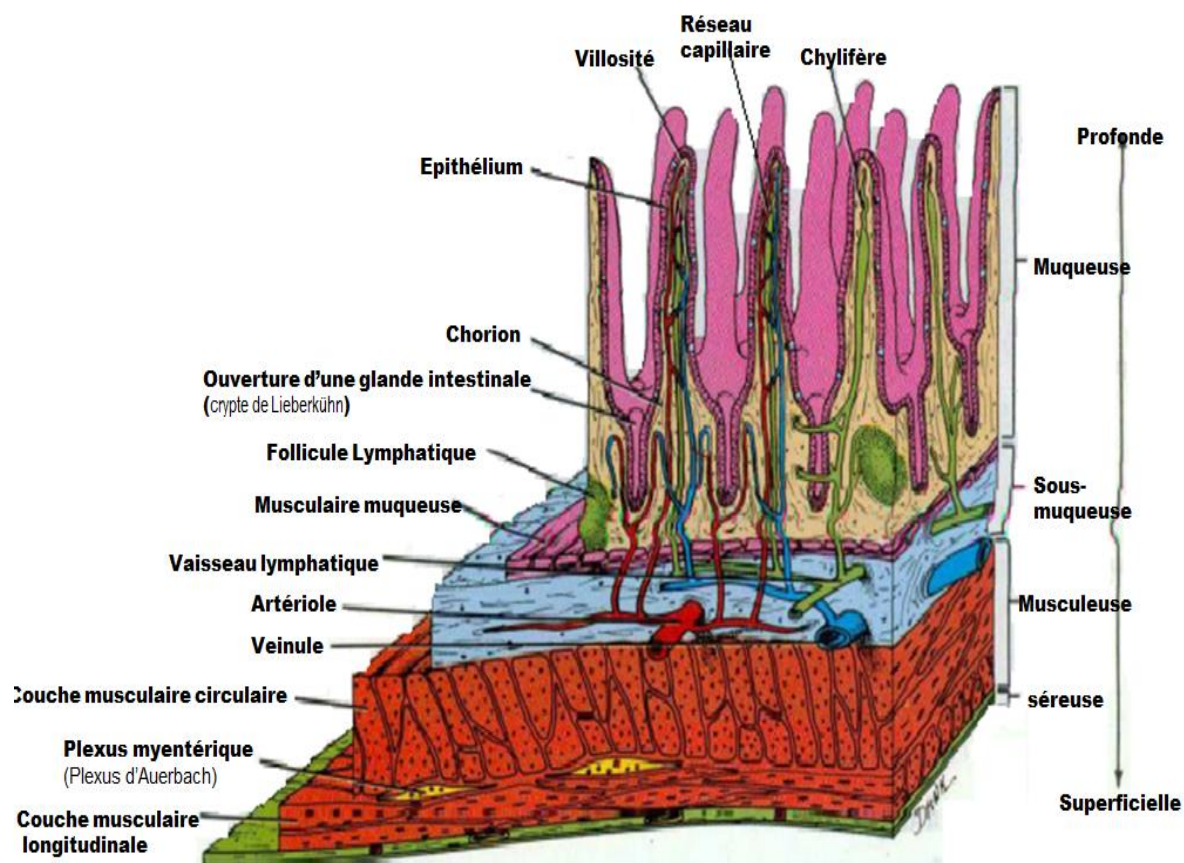


**Figure 4 Jéjunum de Lapin - Coupe histologique – Coloration H.E.S (CNAM - Laboratoire de Biologie Flore Dossou-yovo - photo personnelle)**



- 1- La muqueuse
- 2- La musculaire muqueuse
- 3- La sous muqueuse en jaune safran
- 4- La musculaire muqueuse (2 couches de muscles)
- 5- La sereuse ( en jaune safran)

**Figure 5 : Côlon de Lapin - Coupe histologique – Coloration H.E.S. (CNAM - Laboratoire de Biologie Flore Dossou-yovo - photo personnelle)**



**Figure 6 : Coupe de l'intestin grêle montrant les chylifères et les vaisseaux sanguins du chorion** (TORTORA & GRABOWSKI Principe d'Anatomie et de physiologie 2ième éd. De BOECK Université 1994)

L'épithélium forme également des invaginations qui représentent des glandes intestinales appelées cryptes de Lieberkühn. Les cryptes de Lieberkühn sont des glandes exocrines tubuleuses droites de l'épithélium de l'intestin grêle et du côlon (Figure 3 & 4). Chez le rat, la taille des villosités décroît du duodénum à l'iléon. En effet, une villosité du duodénum a une taille 2 fois plus élevée qu'une villosité iléale [1]. Dans le côlon les deux premières couches présentent comme un relief d'ensemble sans villosités. Ces couches successives (Figure 5) sont respectivement:

- **La muqueuse**, constituée (en partance de la lumière intestinale vers l'intérieur de la paroi):
  - d'un *épithélium* de revêtement en monocouche, présentant une hétérogénéité de plusieurs types de cellules.
  - du *chorion dit lamina propria*, tissu conjonctif aréolaire servant de technostructure de soutien à l'épithélium. Ce tissu conjonctif lâche est formé de fibroblastes, et d'une matrice extracellulaire riche en fibres de réticuline, en collagène et en glycosaminoglycanes. Au sein de cette structure, on distingue des

terminaisons nerveuses, des vaisseaux sanguins et lymphatiques le tout enrichi en cellules de défense comme les lymphocytes, les plasmocytes, les polynucléaires éosinophiles, les macrophages et les mastocytes (Figure 4, 5, 6).

- de la *musculaire muqueuse*, couche musculaire mince sur laquelle reposent l'épithélium et le chorion, et est composée de cellules musculaires lisses.

- **la sous muqueuse**, située entre la muqueuse et la couche musculaire principale, est constituée de tissu conjonctif (fibroblastes, et leur matrice extra-cellulaire). Desservie par des vaisseaux sanguins, lymphatiques, et de tissus nerveux (le plexus de Meissner), elle regroupe aussi des **formations lymphoïdes associées au tube digestif (FLAT)**.
- **la musculuse**, constituée de deux couches de muscles lisses, l'une interne et circulaire, l'autre externe et longitudinale qui assurent le péristaltisme intestinal. Elles sont parcourues de vaisseaux, de tissu nerveux (Plexus myentérique d'Auerbach) et de ganglions appartenant au système nerveux végétatif.
- **l'adventice**, couche la plus externe du tractus gastro-intestinal, entoure la musculuse. C'est du tissu conjonctif lâche constitué de cellules fibroblastes et riche aussi en adipocytes. Elle est desservie par le prolongement des nerfs et vaisseaux des couches supérieures. Lorsqu'elle est recouverte de mésothélium (épithélium plat qui tapisse la face interne de la cavité péritonéale elle s'appelle **séreuse** (Figure 3, 5 & 6).

#### 1.2.2.2. Les différentes cellules constitutives de l'épithélium

Tout le tube intestinal est tapissé d'un épithélium composé d'une monocouche de différentes cellules, liées les unes aux autres par des systèmes de jonctions. Cet épithélium repose sur sa lame basale qui le sépare du tissu conjonctif sous-jacent : la musculuse muqueuse. Ces cellules sont différemment réparties selon la région de la villosité ou de la crypte examinée (Figure 7A).

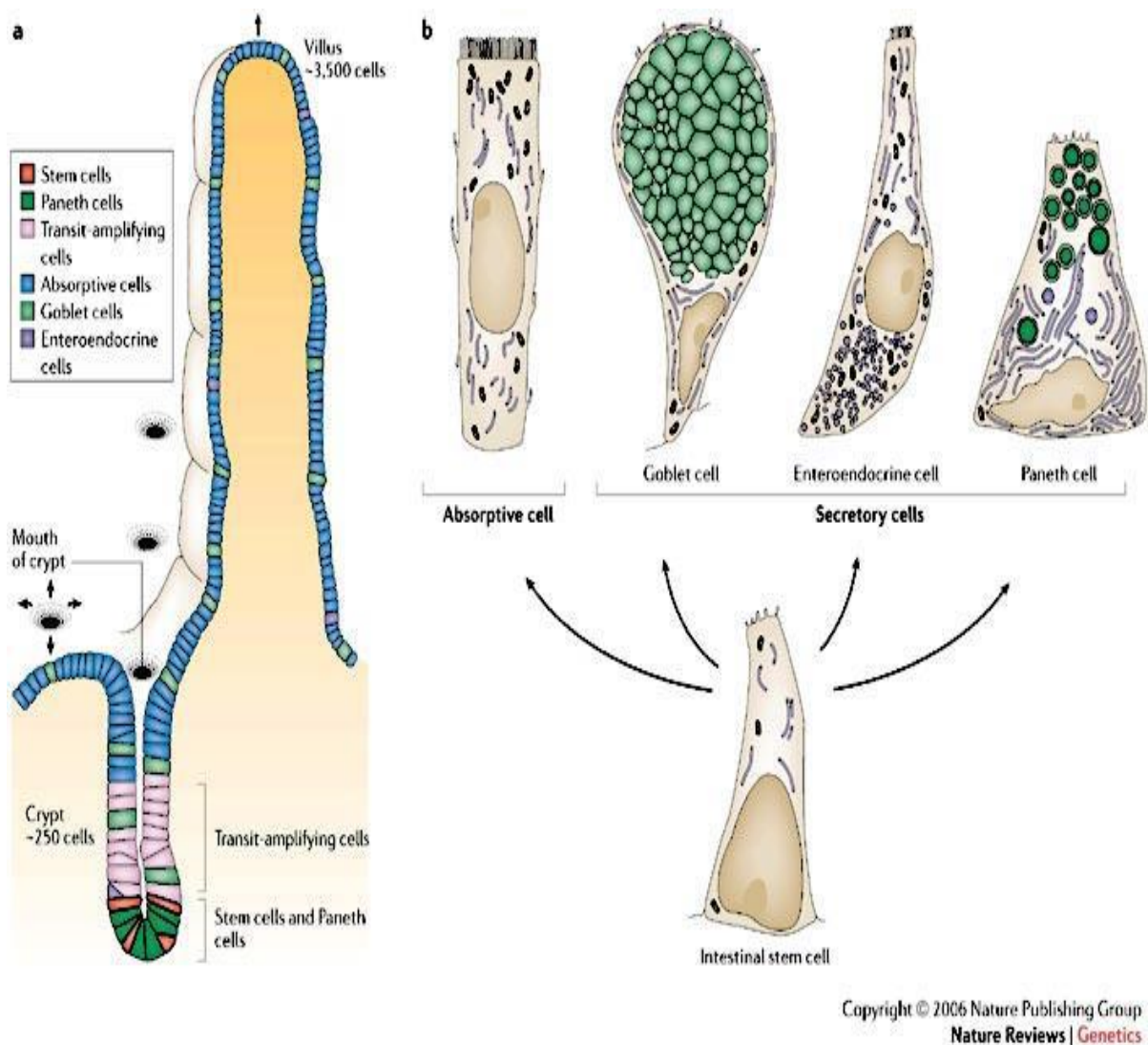
##### 1.2.2.1. Les cellules constitutives des villosités

Sur les deux tiers supérieures des villosités intestinales on retrouve :

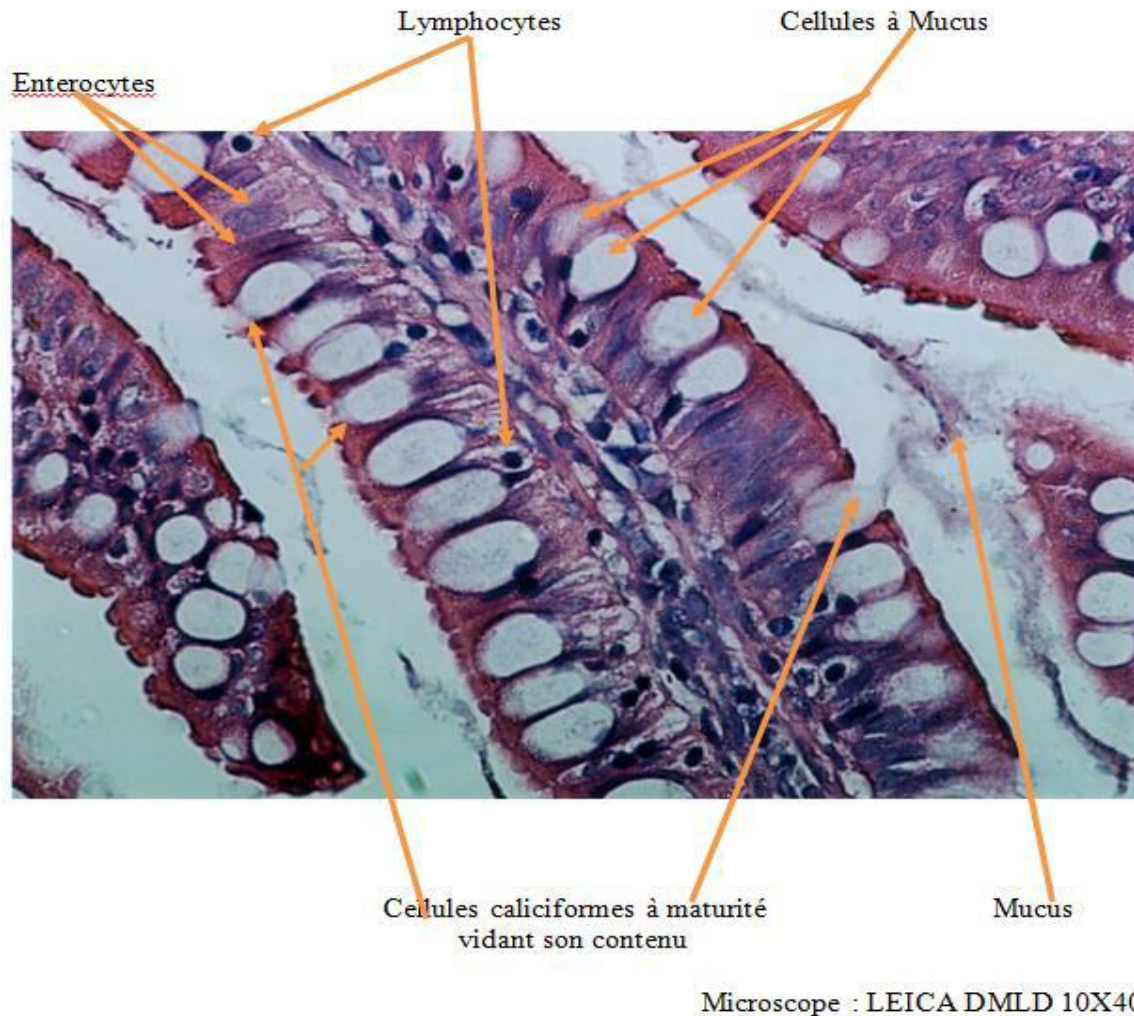
**Les entérocytes** : ces cellules absorbantes et sécrétrices possèdent sur leur pôle apical des microvillosités permettant de multiplier la surface d'échange et elles forment un plateau strié encore appelé bordure en brosse. Elles représentent environ 95% de la population cellulaire totale des villosités intestinales [2, 3] (Figure



7A). Hautement polarisées ces cellules constituent le pôle apical de l'épithélium, recouvert d'une fine couche de 0,1 à 0,5µm d'épaisseur appelée *glycocalyx*. Cette fine couche représente un micro environnement constitué de glycoprotéines de protéoglycans et de glycolipides [4-6] (Figure13)



**FIGURE 7A: La disposition des types de cellules épithéliales de l'intestin grêle chez les mammifères:** Schéma d'une villosité et d'une crypte contribuant au renouvellement cellulaire. La cellule souche (stem cell) située à la base de la crypte donne par division, des cellules progénitrices, lesquelles se différencient pour donner les quatre types de cellules constitutives : les entérocytes, les cellules caliciformes à mucus, les cellules entéro-endocrines, les cellules de paneth. **Crosnier et al. 2006**



**FIGURE 7B** : Coupe de jéjunum de souris en sécrétion, présence de cellules à mucus se déversant dans la lumière. Coloration HES grossissement (X 400) au microscope à épifluorescence. (Photo personnelle Flore Dossou-yovo).

**Les cellules caliciformes:** encore appelées cellules à mucus ou «Goblet cells», se situent davantage dans les deux tiers supérieurs des villosités dans l'intestin grêle, et dans le côlon. Ces cellules dispersées entre les entérocytes, renferment des globules de mucines libérées sous forme de mucus à la surface de l'épithélium; lors de cette libération, le mucus s'hydrate fortement, augmente de volume et forme un hydrogel [7]. Elles secrètent également dans le mucus d'autres types de protéines comme des peptides trifoliés (Tripeptides Factor Family -TFF) impliqués dans les liaisons non-covalentes aux mucines [8, 9] (Figure 7A & 7B). Ce mucus forme des couches stratifiées et recouvre toute la surface de l'épithélium ; Il joue un rôle de lubrifiant et de véhicule, peut «engluer» des microorganismes et influencer également l'absorption de certains peptides [10].

**Les cellules entéro-endocrines:** Les cellules endocrines de l'intestin grêle de forme légèrement triangulaire et d'apex rétréci, représentent une population très hétérogène (Figure 7A). En effet, plus de dix types cellulaires ont été décrits dans la muqueuse intestinale humaine. De petite taille, les cellules endocrines sont localisées à la base des villosités et dans les cryptes. Leur caractéristique commune est de posséder des granules de sécrétion au niveau de leur partie basale [11, 12]. Leur identification est basée essentiellement sur le type de peptides hormonaux sécrétés. Les peptides gastro-intestinaux libérés par ces cellules jouent différents rôles, notamment, dans le contrôle des sécrétions gastriques, pancréatiques et intestinales ainsi que dans la motricité et la trophicité du système digestif [13, 14].

#### 1.2.2.2. Les cellules constitutives des cryptes

Dans les cryptes intestinales, l'épithélium se subdivise en trois zones distinctes : une zone supérieure dont l'organisation est semblable à celle des villosités; une zone médiane constituée de cellules non différenciées en prolifération, et les cellules souches qui assurent le renouvellement de l'épithélium par division asymétrique; une zone inférieure comprenant les cellules de Paneth (Figure 7A).

**Les cellules de Paneth:** les cellules de Paneth, cellules sécrétrices exocrines spécialisées situées au tiers inférieur des cryptes de l'intestin grêle ont migré depuis la zone de cellules souches vers la partie inférieure des cryptes où, elles survivent une vingtaine de jours [11, 15, 16]. Elles secrètent dans le mucus des microgranules situés à leur pôle apical et contenant une série de protéines antimicrobiennes comme le lysozyme (enzyme capable de digérer la paroi en particulier des bactéries Gram-positives) [17], ou d'autres enzymes antibactériennes [18], des cryptidines dites  $\alpha$ - ou  $\beta$ -défensines (selon la distribution des ponts disulfures de leur structure)[19, 20], le tumor necrosis facteur- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) inflammatoires.

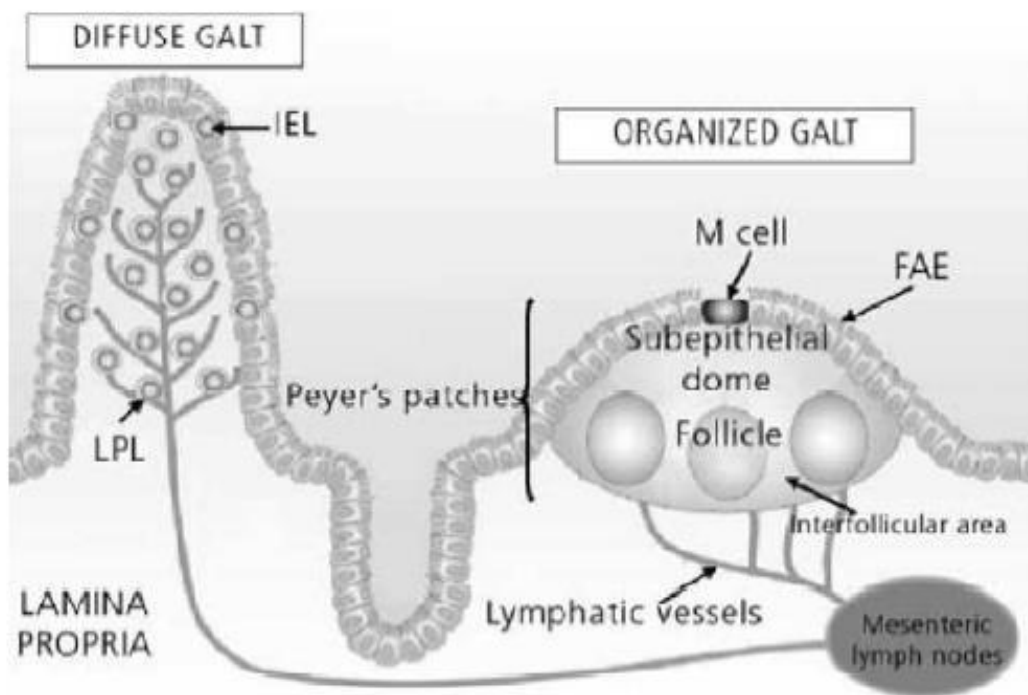
Par l'intermédiaire de ces enzymes et des défensines ainsi que par la phagocytose [3], les cellules de Paneth peuvent limiter la prolifération du microbiote bactérien présent au niveau des cryptes.

**Les cellules souches:** localisées au fond des cryptes, et spécifiquement entre les cellules de paneth, elles s'autorenouvellent par mitose donnant une cellule fille et une copie d'elle-même pour la conservation de leur génome [16]. Ces cellules souches ou « stem cells », sont les précurseurs d'autres cellules et passent par une étape intermédiaire avant la différenciation. Ces cellules sont à l'origine des quatre types cellulaires de l'épithélium : les entérocytes, les cellules caliciformes, les cellules de Paneth et les cellules entéro endocrines [11, 12, 21] (Figure 7A). La division cellulaire est suivie d'une migration et d'une différenciation des cellules le long de l'axe crypto-villositaire. Lors de cette différenciation, les cellules acquièrent des caractéristiques fonctionnelles (activités enzymatiques, sécrétion de mucus) en fonction de leur localisation le long de l'axe antéro- postérieur de l'intestin, de leur position dans l'axe crypto-villositaire et de l'âge de l'individu

Dans ce mouvement de renouvellement des cellules, arrivées au sommet des villosités intestinales, les cellules sénescents meurent par apoptose et desquament dans la lumière intestinale [22, 23].

### 1.2.2.3. Autres cellules intervenant dans la fonction de barrière

**Les cellules « M » au sein des formations lymphoïdes:** Le nom de ces cellules provient de l'expression «**M**icrofold cell ». Elles font partie des cellules épithéliales qui recouvrent le dôme des plaques de Peyer; ces plaques sont des formations lymphoïdes associées à l'épithélium FAE (follicle associated epithelium) ou FLAT ci-dessus nommé. Ce sont des structures arrondies retrouvées le long du grêle et visible à l'œil nu. Le dôme des FAE est dépourvu de cellules caliciformes et donc peu recouvert de mucus et interrompt en surface la continuité de la monocouche épithéliale, mais en profondeur, correspondant à la localisation des cellules M. Ces cellules sont des entérocytes qui ont peu ou pas de glycocalyx, pas de microvillosités, cette morphologie leur permet d'assurer la fonction de surveillance immunologique en capturant des antigènes présents dans la lumière [24] (Figure 7C).



**Figure 7C : Schéma des éléments formant le tissu lymphoïde intestinal.** Le tissu lymphoïde intestinal (GALT) organisé est l'inducteur de la réponse immunitaire (plaques de Peyer et nœuds lymphatiques mésentériques) alors que le GALT diffus en est le site effecteur (lymphocytes intra épithéliaux (IEL) et lymphocytes de la *lamina propria* (LPL)). [25]

**Les cellules dendritiques intestinales:** Elles sont localisées dans les tissus inductifs primaires comme dans les plaques de Peyer, dans les nœuds lymphatiques mésentériques, et sur les sites effecteurs, comme la lamina propria où, ces cellules jouent un rôle dans la tolérance orale (allergie alimentaire) et dans la défense contre les pathogènes de la muqueuse en tant que présentatrices d'antigènes [25]. D'autres études effectuées *in vivo* révèlent que les cellules dendritiques sont à l'état « latent » et ont besoin d'un signal exogène pour transiter de cet état de veille à l'état d'effecteur au cours duquel elles activent les cellules T [26]. Stagg et ses coéquipiers rapportent qu'il existe au moins quatre voies par lesquels les cellules dendritiques peuvent avoir accès aux antigènes, parmi lesquels, celui de relais au transport d'antigène par les cellules M; les cellules dendritiques libèrent différents types de cytokines et ce, en fonction de l'antigène qui est en leur présence [27].

## II. Les propriétés fonctionnelles des différentes couches

Les tissus épithéliaux exercent différentes fonctions: de protection, échange, absorption, péristaltisme, et sensitive. Les caractéristiques phénotypiques variables à l'origine des cellules composant les tissus de ces différentes couches, expliquent leur spécialisation fonctionnelle.

**La muqueuse** du grêle est par excellence le principal lieu de l'absorption intestinale. Elle sécrète des enzymes destinées à compléter le processus de digestion commencé dans l'estomac, puis elle assure sa principale fonction d'absorption d'acides aminés, d'oses, de di/tripeptides, de vitamines, d'acides gras, et de cholestérol [28, 29]. De par sa fonction, elle présente une organisation architecturale conçue pour accroître sa surface, par le nombre d'entérocytes qui portent à leur pôle apical 2000 à 3000 microvillosités très serrées de 0.5 à 1.5  $\mu\text{m}$  de long et 0.1  $\mu\text{m}$  de large selon les espèces (bordure en brosse) [30]. Ce dispositif est recouvert par la fine couche de glycocalyx qui est le siège d'une intense activité enzymatique digestive assurée par l'amino-peptidase, la lactase, la sucrase, la phosphatase alcaline [31, 32].

La couronne de cellules épithéliales qui forme le revêtement de la muqueuse repose sur le *chorion* (ou *lamina propria*) qui à son tour prend appui sur la *musculaire muqueuse*, et forme un ensemble adjacent à la *sous muqueuse*. Ces trois couches ont pour premier rôle, le soutien de la structure de l'épithélium. Leur principale fonction de protection est axée sur la défense antigénique, assurée par le fonctionnement de récepteur, d'effecteur, et d'inducteur de réponses immunitaires.

Nous rappelons ainsi la fonction de récepteurs et de transporteurs d'antigènes des cellules M, le système immunitaire diffus que représentent les nombreux lymphocytes disséminés dans la lamina propria, les cellules immunitaires



organisées qui forment par endroit un tissu lymphoïde présentant des amas folliculaires associés à la sous-muqueuse (FLAT ou GALT, plaques de Peyer), la réponse immunitaire sécrétrice de cytokines des cellules dendritiques. Le passage de ces antigènes à travers l'épithélium stimule les lymphocytes sous-jacents qui induisent des réponses immunes adaptées [33]. Les cellules M assurent aussi la transcytose des bactéries commensales et par cette fonction deviennent naturellement vulnérables parce que prédisposent le passage de certains pathogènes [34]. Ce sont ces plaques de Peyer qui sont l'inducteur de la réponse immunitaire. Quant au système diffus, il représente l'effecteur de la réponse intestinale immunitaire (Figure 7C).

**La musculuse** a pour fonction de faire progresser le contenu de la lumière digestive par péristaltisme, mouvement musculaire synchronisé générant des vagues de contractions qui se déplacent d'amont en aval avec pour but de refouler le chyme [35]. Elle est aussi innervée par le plexus d'Auerbach.

Ainsi, l'intestin a une structure complexe permettant des fonctions diverses: le rôle de protection contre toute invasion nuisible, le rôle de barrière sélective assurant l'organisation contre la rupture de l'homéostasie de l'organisme. La protection première est assurée par le biais du glycocalyx qui lui-même est surmonté par des couches de mucus. Dans la partie (II) qui suit nous aborderons les caractéristiques de ce gel qui tapisse tout le tract gastro-intestinal (TGI).

## **CHAPITRE 2:**

### **La perméabilité intestinale**

#### **I. Les bases fondamentales d'évaluation du passage intestinal**

L'intestin est formé par une monocouche de cellules épithéliales qui constituent la principale surface d'absorption de l'organisme au travers de la muqueuse intestinale. Dans la lumière intestinale, avant que les molécules n'atteignent le niveau des cellules épithéliales, elles sont d'abord mises en contact avec différents films d'eau soit agitée, ou stagnante (unstirred Water Layer – UWL) [36], avec des couches de mucines hydratées très fluides soit mobiles, ou denses et adhérentes [36-38]. Cet ensemble de différentes couches communément appelées « UWL » par certains auteurs et « mucus » par d'autres, constitue l'un des premiers milieux que traversent les particules, avant de passer à travers les structures de la membrane plasmique pour atteindre le sang.

Plusieurs travaux et articles ont prouvé l'existence, les rôles et les fonctions de ces couches.[10, 38-41], des études se sont par ailleurs intéressées aux conséquences de sa détérioration, ou aux conséquences que son inexistence pourrait engendrer [42-44].

##### **1.1. Les différents itinéraires et mécanismes de transport des xénobiotiques et ou leurs métabolites**

Le mécanisme de transport passif ou actif des xénobiotiques, utilise au contact de l'épithélium différentes voies de passage. Le choix de ces mécanismes et de ces voies sont souvent fonction de la nature et des propriétés physico chimiques de la molécule.

##### **1.2. Quels sont les itinéraires empruntés par les xénobiotiques?**

Le passage des molécules à travers l'épithélium suit deux voies [45]:

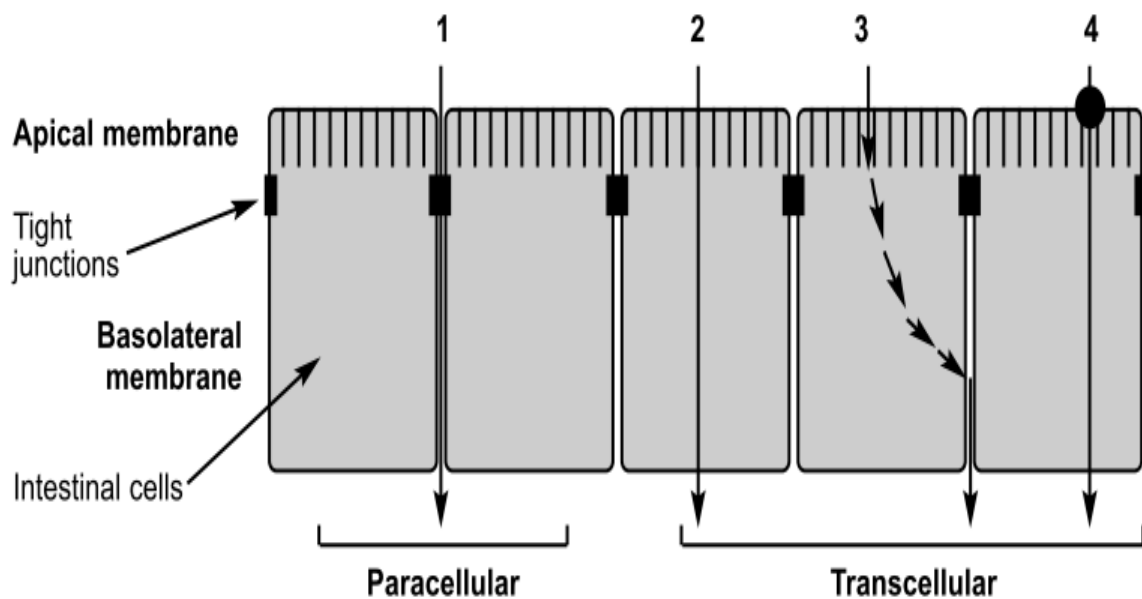
- la voie transcellulaire, où la molécule entre par la face apicale de la membrane plasmique de la cellule, pénètre le cytoplasme et peut sortir par la face basolatérale de celle-ci;

- la voie paracellulaire, où la molécule emprunte l'espace situé entre deux cellules adjacentes (Figure 8).

## 1.2. Les différents mécanismes d'action

Selon la voie et le moyen de passage utilisés par la molécule, les mécanismes de transport se classe en (Figure 8) :

- La diffusion passive. La molécule est soumise à la force imposée par le gradient de concentration électrochimique (résultant du gradient de concentration et du potentiel électrique des membranes) ou à la pression hydrostatique existant entre les deux faces membranaires des cellules. Cette diffusion peut être paracellulaire ou transcellulaire et ne nécessite aucune source d'énergie.
- La diffusion facilitée ou le transport facilité. La molécule est associée à un transporteur. Ce dernier peut être paracellulaire ou transcellulaire, ne nécessite, comme dans le cas précédent, aucune source d'énergie, mais une reconnaissance cellulaire de la molécule par la protéine transporteuse spécifique (carrier protein) ou par le canal. Cette voie est surtout empruntée par les hexoses et les acides aminés en co-transport avec le sodium au niveau de la membrane apicale ; elle peut être inhibée de façon compétitive par un analogue structural [46].
- Le transport actif. Ce passage requiert un apport d'énergie (hydrolyse de l'ATP ou participation d'une force motrice résultant de l'énergie stockée dans un gradient ionique) puis nécessite une reconnaissance cellulaire de la molécule par le transporteur. Il s'effectue dans le sens contraire du gradient de concentration ou dans le sens des sécrétions par des transporteurs d'efflux.



**Figure 8 : Voies et mécanismes du transport des molécules à travers l'épithélium intestinal.**

1. Voie paracellulaire ; 2. Diffusion passive trans-cellulaire ; 3. Transcytose ; 4. Voie d'une protéine transporteuse à la face apicale suivie d'une diffusion passive à travers la membrane basolatérale. D'après une publication du Centre européen pour la validation des méthodes substitutives (European Centre for Validation of Alternative Methods – ECVAM). E. Le Ferrec et al. (2001).

Dans les conditions physiologiques, les solutés (polaires ou non) qui empruntent la voie paracellulaire sont hydrosolubles ; ils ne peuvent traverser les doubles couches lipidiques de la membrane (transport transcellulaire) qu'au moyen d'un transport actif, c'est-à-dire couplé à un transporteur. La surface occupée par la voie paracellulaire est celle des jonctions étanches qui ont des diamètres de pores peu larges. La superficie occupée par ces jonctions représente 0,01 % de la surface totale des voies accessibles de l'épithélium [47]. La masse de petites molécules hydrosolubles transportables par cette voie est donc très limitée

Ces différentes formes de transport ne s'effectuent pas sans contrainte, ce qui confère à l'épithélium sa fonction de barrière intestinale. Avant d'aborder les modèles d'évaluation de la perméabilité intestinale il est important de porter une analyse particulière aux différentes barrières physiques, biochimiques et parfois structurelles.

## 2. Les barrières physiologiques: éléments déterminant du passage

## **2.1. Les Barrières physiques**

### **2.1.1. La couche d'eau non agitée**

Les caractéristiques structurelles et triviales de l'eau (H<sub>2</sub>O) et ses nombreuses propriétés physicochimiques, (point de congélation, de fusion, constante diélectrique, électronégativité, surface tensioactive etc.), s'expliquent, par la force d'adhérence exceptionnellement élevée des liaisons d'hydrogène. Les interactions entre molécules d'eau ou autour de particules permettent la formation d'agglomérats d'eau nommés « clusters » [48, 49]. Ces structures ont la facilité de former des liaisons hydrogènes avec les constituants de la membrane cellulaire ou avec les glycoprotéines du mucus [50, 51]. La couche d'eau non agitée localisée au-dessus des couches de mucus, forme un ensemble nommée « unstirred water layer » (UWL) [36, 52]. Dans les conditions *in vitro*, cette couche d'eau peut être épaisse et interagir avec les membranes plasmiques même en l'absence de mucus [53, 54]. Depuis les années 1949 Zwolinski et ses collaborateurs, puis Loftsson et son équipe, et tout récemment Sugano, ont considéré qu'au niveau du tractus gastro-intestinal l'UWL constitue l'une des premières barrières physiques qui entrave la biodisponibilité orale [55, 56]. Comme nous le soulignons dans les données *in vivo*, *in situ*, cette UWL n'est pas que de l'eau mais de l'eau fortement liée à un gel possédant une structure et des propriétés qui influent sur le transport des différents xénobiotiques : le mucus.

### **2.1.2. Le mucus: origine, composition, structure, fonctions et propriétés**

Si le chapitre concernant le mucus est assez détaillée dans notre partie bibliographique, c'est parce qu'il représente l'une des premières lignes de défense innée, qui de par sa structure, sa composition et ses fonctions, influe soit sur la perméabilité en particulier intestinale, soit, sur la biodisponibilité orale.

#### **2.1.2.1. Origine et localisation**

Les termes mucus, muqueuse, mucine, sont apparus il y a déjà plusieurs siècles dans le vocabulaire médical. Le Dictionnaire historique de la langue française atteste de l'usage dès 1520 du terme muqueux: «qui contient du mucus, en secrète», le terme mucus étant lui-même un emprunt savant tardif (1750) du latin i.e. visqueux, gluant [6].

Dans le règne animal diverses espèces utilisent la sécrétion de mucus pour une adaptation protectrice ou fonctionnelle au contact du milieu environnant; c'est le cas des vers de terre, de certains mollusques mais aussi de certains poissons et chez les mammifères de nombreux organes. Le concept de « rôle protecteur des organes creux » attribué à la sécrétion de mucus avec la découverte de ses

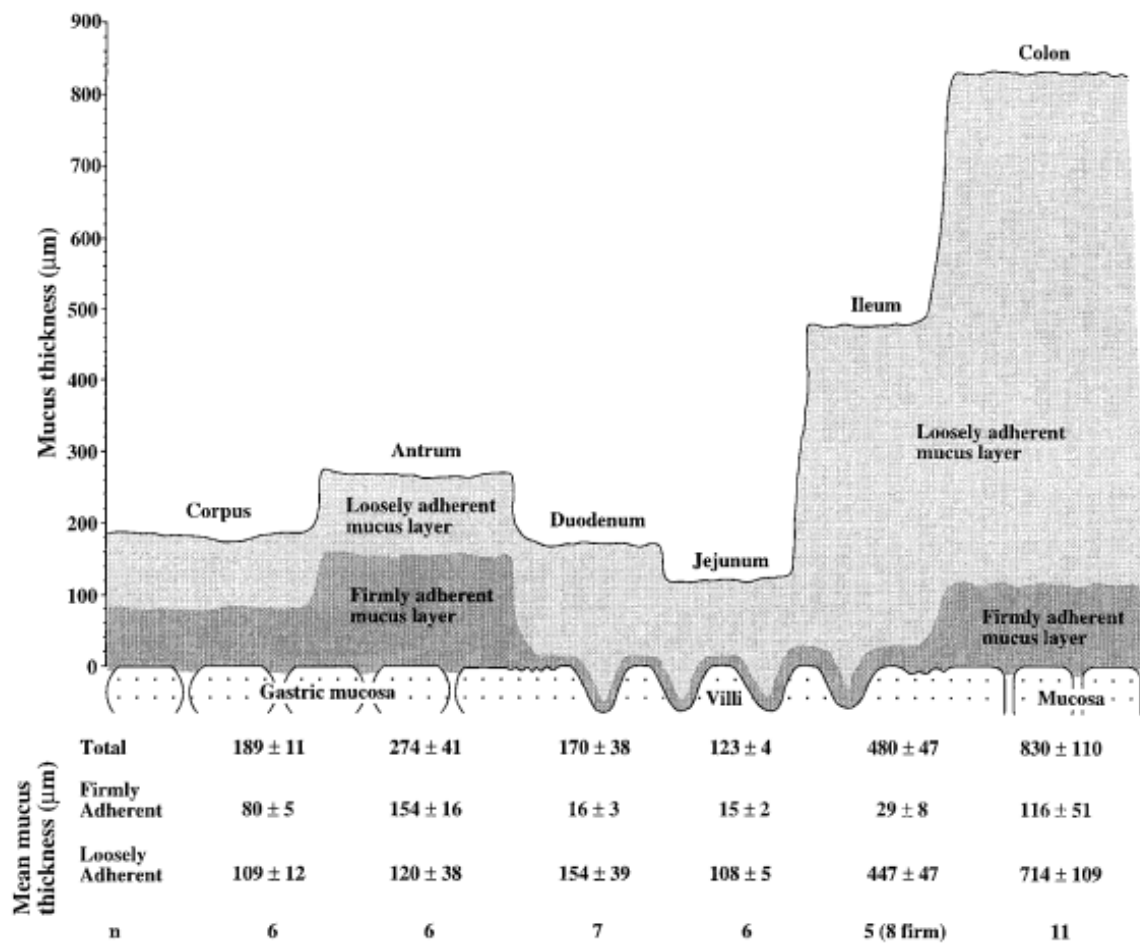
constituants caractéristiques, les protéines mucines [6, 38], est donc très ancien, mais reste toujours très actuel.

Chez l'homme le mucus est sécrété par des cellules spécifiques : cellules caliciformes (ou goblet cells) et par les glandes muqueuses. Il couvre différents tissus épithéliaux appartenant à des organes aux fonctions physiologiques très variées. Ces organes exposés à l'environnement sont les yeux, les voies respiratoires, les voies urinaires et la vessie, la vésicule biliaire, les voies de la reproduction, les voies pancréatiques, le tractus gastro-intestinal [57].

Les cellules sécrétrices de mucus sont intercalées entre les entérocytes de la muqueuse intestinale tandis que les glandes à mucus se situent plus en profondeur sous la rangée des cellules entérocytaires. Ces glandes sécrètent comme les cellules séreuses, mais le mucus est parfois fluide et dépourvu de glycoprotéines.

De nombreux travaux ont démontré qu'il existe une couche continue de mucus depuis l'estomac jusqu'aux parois intestinales [37, 58] (Figure 9). Les principaux constituants du mucus sont des glycoprotéines encore appelées mucines, des lipides, de l'eau, et des électrolytes. En moyenne les mucus contiennent près de 95% d'eau, 0.5–5% de glycoprotéines et de lipides, 0.5–1% de sels minéraux, et 1% de protéines autres sécrétées ou transsudées [59]. La composition du mucus varie selon: son site de sécrétion, son rôle physiologique, et l'état du sujet. Les observations de Meslin et de ses collaborateurs montrent que le nombre de cellules à mucus et la nature du mucus qu'elles contiennent peuvent varier selon la nature de l'aliment ingéré (type de fibres) et selon la composition de la colonisation microbienne des animaux [60].

## GASTROINTESTINAL MUCUS



**Figure 9 :** Schéma montrant l'épaisseur des deux couches de mucus au niveau du corpus, de l'antré, du milieu du duodénum, du jéjunum proximal, de l'iléum distal, et du côlon proximal du tube digestif du rat. La couche de mucus est continue le long du tube. Le tableau joint à la figure présente la moyenne des mesures des différentes sur (n) rats [37]

### 2.1.2.2. La composition et la technostucture du mucus

#### *L'eau*

L'eau occupe une partie importante dans la composition du mucus 95%. Certains pharmacologues et auteurs menant des études focalisées sur l'amélioration de la biodisponibilité des médicaments et produits faiblement bio-disponibles, ont relevés l'importance de ces couches UWL (eau non agitée et mucus) juxtaposée à la membrane et leur rôle dans l'évaluation de la perméabilité [36, 55]. Nous reviendrons sur cette notion dans la partie consacrée au flux.

#### *Les lipides*

L'intégrité du mucus en tant que barrière intestinale est maintenue grâce aux étroites interactions entre les différents constituants les glycoprotéines (ou mucines) d'une part et les lipides (phospholipides) d'autre part [61-63]. Bien qu'ils représentent une infime proportion du mucus intestinal, les phospholipides sont indispensables du maintien de la fonction de barrière. D'après les études menées sur différents animaux (chien, porc et rats, ces phospholipides sont composés en majorité de phosphatidylcholine (PC) 35% à 72% et, à plus faible concentration de, phosphatidylethanolamine (PE) 10% à 32%, de lysophosphatidylcholine (LPC) 5% à 33%, de phosphatidylinositol (PI) 3% à 5%, de phosphatidylglycérol (PG) 1% à 5%, de sphingomyeline (SM) 5% à 11% et de phosphatidylserine (PS) 0% à 5% [63, 64]. Le mucus humain et celui des rongeurs sont similaires en matière de composition en phospholipides, les pourcentages de certains d'entre eux varient dans les cas de maladies inflammatoires ; il est noté une diminution des PC dans le mucus de l'iléon et du côlon de sujets souffrant de rectocolite hémorragique [63].

Okuyama et son équipe ont montré, chez des lapins nouveaux nés, adultes et sénescents qu'avec l'âge, les phospholipides décroissent significativement en concentration. Ils passent de  $21 \pm 2$   $\mu\text{mol/g}$  mucus frais, à la naissance à  $2 \pm 1$   $\mu\text{mol/g}$  mucus frais, après 28 jours. Chez l'adulte on l'évalue à  $1 \pm 1$   $\mu\text{mol/g}$  [65].

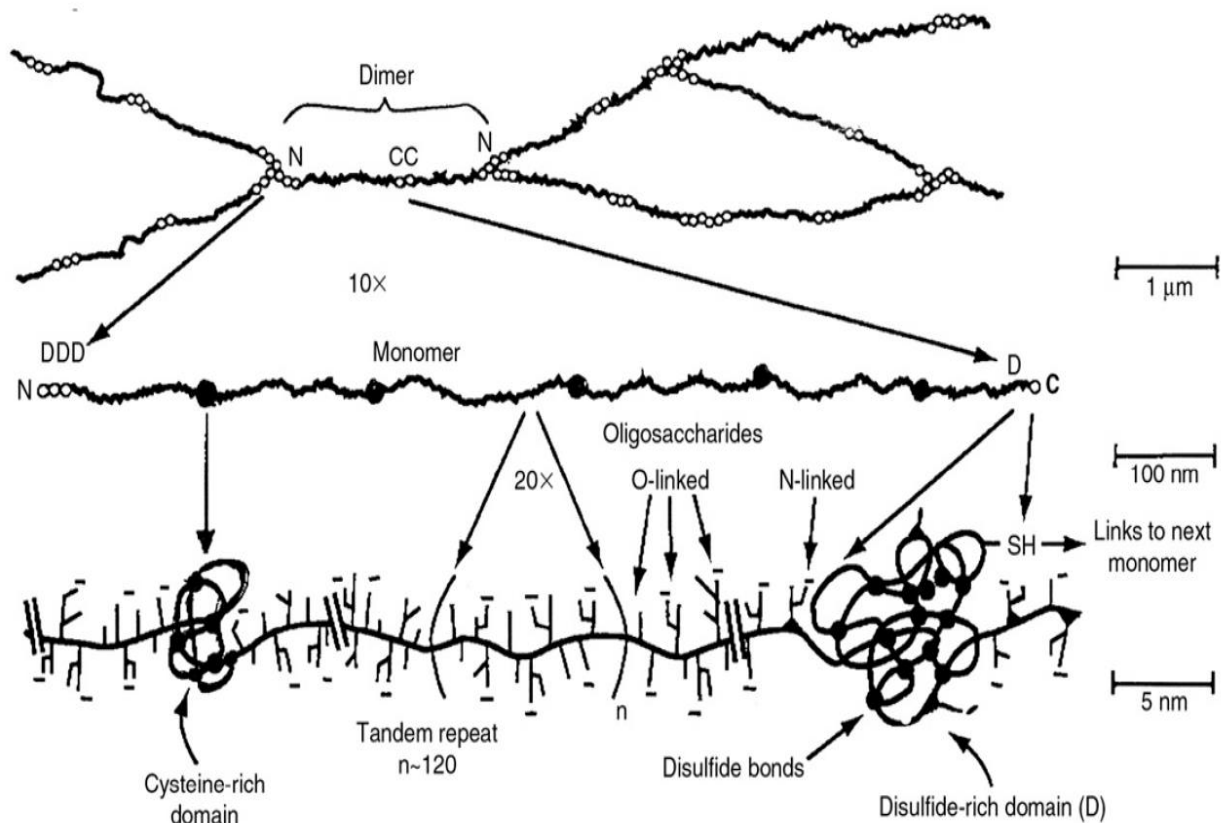
### ***Les protéines***

Les glycoprotéines encore appelées mucines sont les principales protéines représentées dans le mucus. Elles sont responsables de sa structure et de ses propriétés, nous développerons dans le paragraphe ci-dessous, l'importance et le rôle des mucines (MUCs). Dans la composition du mucus on observe d'autres protéines à plus faible concentrations; l'analyse protéomique effectuée par Johansson et ses collaborateurs sur les deux types de mucus (fluide et adhérent), révèle l'existence de plus de 40 protéines sécrétées ou libres dans l'espace extracellulaire. Ces protéines proviennent des débris cellulaires ou des sécrétions et, possèdent probablement des fonctions spécifiques au sein du mucus [38].

Trois d'entre elles ont fait l'objet de nombreuses études et ce pour l'analyse de leurs fonctions et de leurs propriétés. Elles sont sécrétées par les cellules caliciformes. Ce sont :

- le « Fc-gamma binding protein » (FCGBP), protéine intestinale formant une liaison covalente avec les mucines (notamment avec MUC2) et est identifiée comme la seule protéine fortement associée aux sous-unités de la mucine MUC2 [66]. Cette protéine est souvent localisée dans le mucus du côlon et dans les selles des murins et a pour rôle la stabilisation et la réticulation des réseaux de mucines de la couche adhérente interne [67].





**Figure 10: Résumé de la structure biochimique des mucines présentées avec trois différents grossissement** ( schéma modifié de Cone et al. 2009)

- les « Trefoil Factor Family » (TFF) en particulier le TFF3 qui est localisé dans le mucus intestinal, sont des peptides sécrétés riches en cystéine [67]. Certains interviennent dans les divers processus de protection et de réparation de la muqueuse [68]. Par exemple seuls les dimères de TFF3 jouent un rôle protecteur dans la rectocolite hémorragique (RCH) lorsqu'on les administre directement dans la lumière intestinale; quant aux monomères aucun effet n'est enregistré [69]. De récentes études sur les mécanismes moléculaires précisent que les TFF3 facilitent la migration des cellules au lieu de restitution et non la prolifération des cellules ; de plus, ces peptides bloquent l'apoptose et contribuent aux réponses immunitaires innées gérées par le système sensitif des muqueuses, envers les microorganismes commensaux les «Toll-like receptor family, TLR2 TLR4» [70].

Selon les récents travaux d'Albert et de son équipe ces deux protéines FCGBP et TFF3, forment des hétéromères grâce à l'établissement des liaisons disulfures. Ces hétéromères se fixent à l'immunoglobuline liée aux MUC2 ; ces interactions contribuent à densifier l'enchevêtrement du réseau des mucines qui modifient les propriétés rhéologiques du mucus [66, 67].

- Les « Resistin-like Molecule  $\beta$  » (RELM  $\beta$ ): ce sont de petites molécules de protéines secrétées par les cellules caliciformes, riches en cystéine, appartenant à la famille des molécules de cytokines « résistine-like ». Elles se présentent sous forme de dimères disulfure-dépendant. Elles sont fortement induites dans les cellules intestinales à mucus lors des infections par des bactéries entériques ou par des vers parasites ou lors des maladies inflammatoires de l'intestin [71, 72]. Elles ont une fonction non seulement comme effecteur de molécules cytokines mais aussi comme inhibiteur des constituants chémo-sensoriel des parasites [73].

### ***Les glycoprotéines ou mucines***

La technostucture du mucus repose sur les mucines, qui sont des protéines fortement glycosilées [74]. Ces glycoprotéines filamenteuses de très haute masse moléculaire, porteuses de milliers de chaînes O-glycanniques possèdent le plus souvent un domaine peptidique avec la caractéristique particulière d'être riches en acides aminés surtout de type proline, thréonine, sérine, alanine, glycine et quelques traces d'acides aminés aromatiques et organisé en répétitions en tandem de motifs élémentaires plus ou moins conservés [75] (Figure 10, 11 et 12).

Le squelette protéique des mucines MUCs est codé par des gènes nommés *MUCs*. Ces protéines semblent actuellement se regrouper en deux grandes familles:

- 1° les mucines secrétées dites « secreted gel-forming mucin » ou « vraies mucines »
- 2° les mucines membranaires ou « membrane-associated mucins »

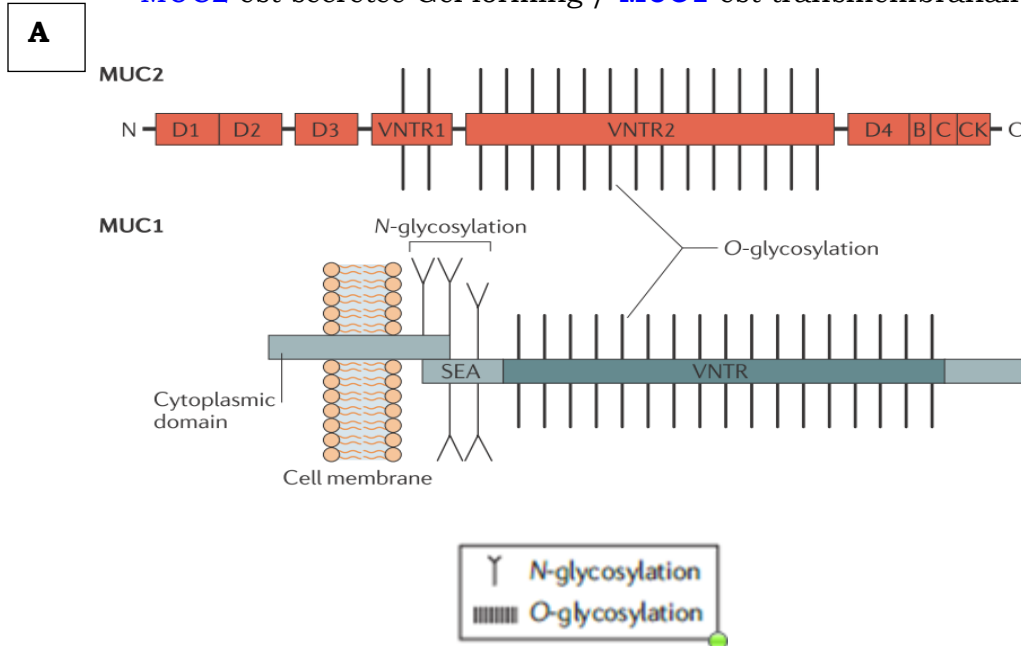
D'autres mucines découvertes mais dont les caractéristiques ne sont pas encore entièrement révélées sont regroupées sous les termes de « mucines inclassables » ou « solubles » [6, 76] ou « non-gel-forming secreted mucin » [77].

### ***Les mucines secrétées***

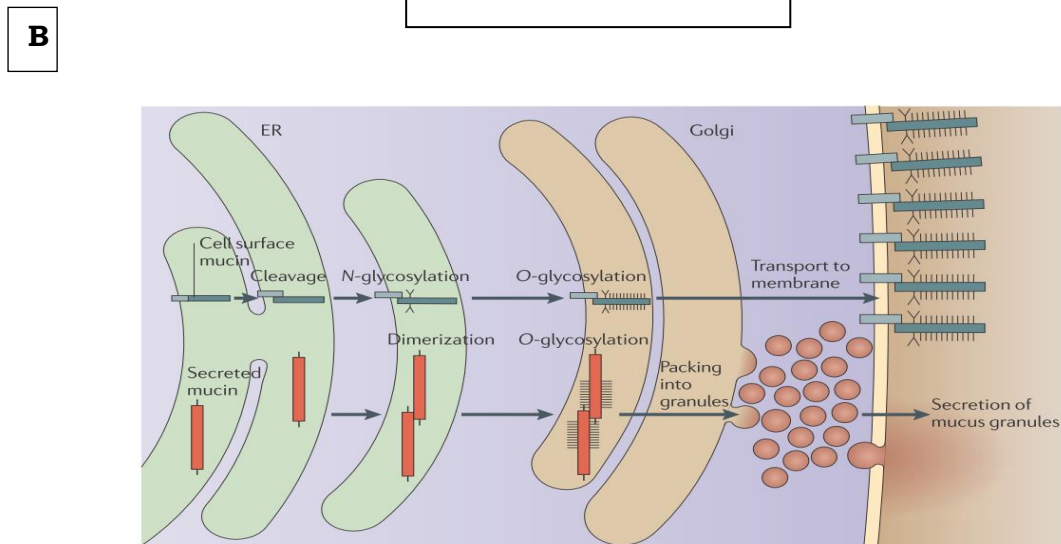
Les mucines secrétées non solubles et dites « flexibles » sont codées par quatre gènes physiquement proches et localisés sur le chromosome 11 en p15.5 [78]. Ce sont principalement, *MUC5AC* et *MUC5B* mais aussi *MUC2*, *MUC6* [6] et *MUC8* et *MUC19* [79]. Elles forment un réseau macromoléculaire par l'établissement de ponts disulfures, et sont responsables des propriétés rhéologiques du mucus (élasticité, viscosité, filance, adhérence) [74]. Leur flexibilité s'explique par la succession et l'alternance de chaînes étirées hydrophiles avec des régions hydrophobes de protéines très enroulées sur elles-mêmes en forme de boules [80] (Figure 10). Certains auteurs tiennent compte des liaisons des ponts disulfures ou des liens hydrophobes [81] et décrivent des chaînes entremêlées; d'autres supposent des rouleaux de macromolécules entremêlés [82]. En ce qui concerne la protéine intestinale *MUC2* c'est au niveau de la lumière du réticulum endoplasmique qu'elle forme des dimères en se pliant grâce à l'établissement des ponts disulfures, et des nœuds de cystéine [10, 83, 84]. Dans l'appareil de Golgi, ces dimères sont O-glycosylés puis regroupés dans des vésicules ; avant d'être secrétés ; les extrémités

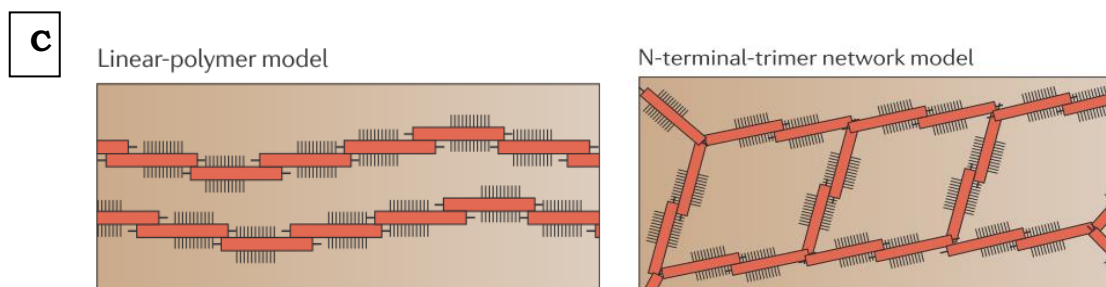
N-terminales de ces dimères se rattachent aux ponts disulfures pour former des trimères [10, 83, 85] (Figure 11A, 11B et 11C). Les mucines sécrétées s'expriment typiquement dans les cellules épithéliales spécialisées pour le stockage et la sécrétion apicale de grains de mucus: cellules caliciformes (goblets cells) pour MUC2 et MUC5AC, glandes muqueuses pour MUC5B et MUC6 [86, 87].

MUC2 est sécrétée Gel forming / MUC1 est transmembranaire



### Synthèse des mucines





**FIGURE 11 A, B, C** **Secrétion, Synthèse et Polymérisation des Mucines (McGucking 2011)**

### ***Les mucines épithéliales membranaires***

Les mucines associées aux membranes rigides (Figure 11A) et dites « étirées » sont codées par les gènes *MUC1*, *MUC4*, *MUC11*, *MUC13*, *MUC15*, et *MUC20*. On leur attribue les fonctions de récepteurs de surface cellulaires pour les pathogènes et d'activation des voies signalétiques intracellulaires [79].

À la différence des mucines sécrétées, les mucines membranaires sont exprimées par de nombreux types de cellules épithéliales de l'organisme [6]. Elles sont ancrées dans la membrane cellulaire par un domaine unique nommé « SEA domain » (Sea-urchin sperm protein, Enterokinase and Agrin) qui subit une auto-protéolyse; ce sont les glycoprotéines *MUC1*, *MUC3*, *MUC12*, *MUC13*, *MUC16*, *MUC17* et d'autres. Ces SEA domaines peuvent s'extirper lors d'un stress mécanique sans détruire la membrane.

### ***Les mucines dites « non-gel forming secreted mucin »***

Il y a plus d'une quinzaine d'années, la plupart des mucines, encore très peu étudiées ont été nommées « les mucines inclassables ou non mucines ». Elles sont appelées « Les mucines solubles » par Moniaux [76], et « non-gel forming secreted mucin » par Linden [77]. L'expression de la plupart de leurs gènes, regroupent les petites O-glycoprotéines transmembranaires ou non. Ce sont *MUC7*, *MUC8*, *MUC9*, *MUC10*, *MUC13*, *MUC14*, *MUC15*, *MUC16*, *MUC18* [6]. Mieux identifiées de nos jours, certaines de ces mucines sont à présent classées parmi les sécrétées pour *MUC7*, *MUC8*, les membranaires pour *MUC13*, *MUC15* dans les travaux de [79]. *MUC16* et *MUC17* sont citées parmi les membranaires par McGuckin en 2011 [83]. En référence à la classification proposée par l'Organisation du Génome Humain (HUGO) et le comité de nomenclature des gènes (HGNC), qui font état de deux familles: les mucines sécrétées et les mucines liées aux membranes plasmiques [88] et en complément des sites d'expression et des molécules antimicrobiennes spécifiques ou non spécifiques sécrétées de différentes régions du TGI [83] nous présentons le Tableau 1.

L'équipe de McGucking souligne que le modèle d'expression et la nomenclature sont identiques chez la souris excepté le *MUC 17* humain qui se nomme *MUC3* chez la souris. La glycosylation d'une mucine peut varier d'un tissu à un autre ou entre

populations de cellules caliciformes. Elle peut aussi être modifiée ou influencée lors d'une infection ou par des facteurs d'inflammation. Ces auteurs nous reconfirment que la MUC2 est la glycoprotéine la plus exprimée dans le côlon.

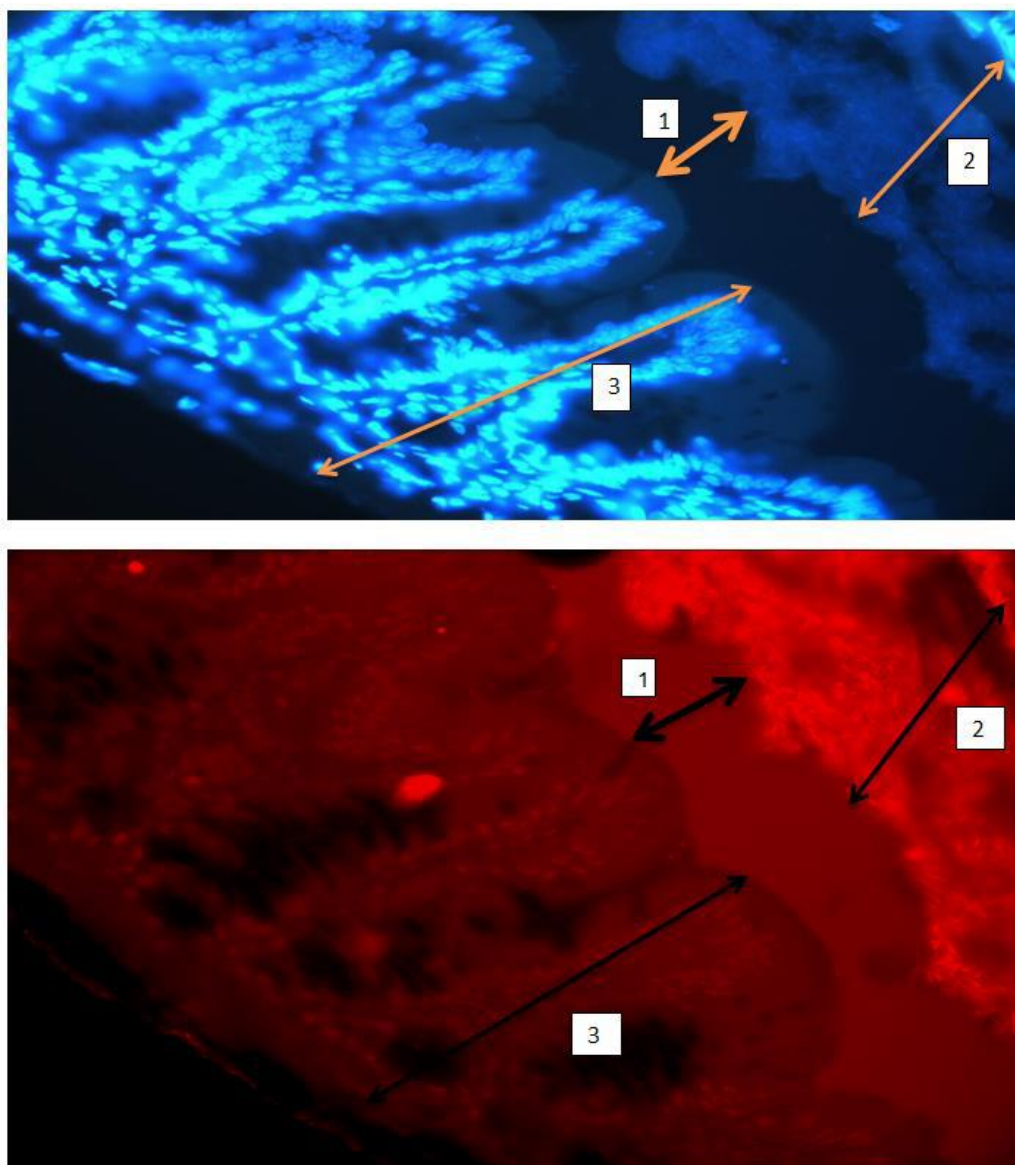
Ces différentes interprétations de la structure peuvent être liées aux différentes méthodes utilisées pour déterminer la structure, au maniement pendant la collection de mucines ou lors de la préparation des échantillons et peuvent dépendre aussi de la concentration de mucine de la solution [57, 84, 89]. Une relation entre la technostruture de ce gel et le transport des particules n'est pas encore bien élucidé. Si la composition du mucus ou de l'UWL est bien connue sa technostruture l'est beaucoup moins vu que ce gel n'est pas statique, mais dynamique, la formation d'agrégats ou la gélation des molécules de mucines étant fonction de paramètres comme le pH, la température [57, 84, 89]. Le mucus est plutôt examiné sur deux plans:

MUC protein	Amino acids in TR	Main locationOf expression	Chromosome locus	Nonspecific Antimicrobials	Antigen specific antimicrobial
<b>Secreted</b>					
MUC2	23/16	Small intestine, côlon, tracheobronchial tissue	11p15.5	$\alpha$ -defensins	slgA
MUC5AC	8/5	Stomach, respiratory tissue, Brunner's glands, salivary glands, tracheobronchial tissue	11p15.5	$\beta$ -defensins	slgA
MUC5B	29	Brunner's glands, endocervix, gall blader, pancreas	11p15.5	$\alpha$ -defensins	slgA
MUC6	169	Stomach, gall blader, Brunner's glands,	11p15.5		IgG
MUC7	23	salivary glands	4q13.3	$\beta$ -defensins	IgG
MUC8	13/41	tracheobronchial tissue	12q24.3		
MUC19Prédicte	7/7/15/16/9/8/5	salivary glands, trachea bronchial tissue	12q12	Cathlecidins, histatin, lactotranferrin	IgM
<b>Membrane bound</b>					
MUC1	20	All epithelia	1q22	$\alpha$ -defensins	slgA
MUC3A	17/375	Small intestine, côlon, gall blader	7q22	Cathlecidins	IgG
MUC3B	17/375	Small intestine, côlon,	7q22.1	lysozyme	IgM
MUC4	16	Virtually all epithelia	3q29	Angiogenin 4	
MUC12	28	Côlon	7q22.1	Lectins (e. g, REGIII $\alpha$ )	
MUC13	15	Trachea, Small intestine, côlon,	3q21.2	Secretory phospholipase A2	
MUC15	NONE	Spleen, Small intestine, côlon, prostate, lung	11p14.2	Lipopolysaccharide binding protein	
MUC16	156	Ovarian tissue, ocular tissue	19p13.2	Collectins	
MUC17	59	Pancreas, Small intestine, côlon,	7q22.1	histatins	
MUC20	19	Renal tissue	3q29		

**Tableau 1 : Sites d'expression des mucines secrétées ou membranaires, et des antigènes antimicrobiens du TGI.** Illustré à partir des informations de [83, 88]

**Sur le plan morphologique:** Le mucus dans le côlon du rat est formé de deux couches de gel fonctionnellement distinct : la première, ferme, insoluble et

adhérente couvre les cellules épithéliales et constitue la barrière effective contre les agressions externes; cette couche est exempte de bactéries, spécifiquement dans le côlon, formée par des feuilletts denses de mucines, d'épaisseur allant de 50 à plus de 100  $\mu\text{m}$  dans le côlon du rat [38, 53, 77], la seconde couche, plus fluide, faisant près de quatre fois l'épaisseur de la couche adhérente et ce, grâce à des clivages protéolytiques qui favorise l'organisation en maillage (structure en filet ou mailles de largeur variable) se superpose à la première et est en contact direct avec la lumière [10, 41, 80]. Cette seconde couche plus externe, est colonisée par les bactéries commensales qui liées aux protéoglycannes spécifiques utilisent les mucines comme source d'énergie [90]. Elle peut s'extraire de la lumière par simple succion [37, 40] (Figure 12 A et B). La « gel-forming » MUC2 la principale, la plus sécrétée par les cellules caliciformes intestinales est responsable de l'architecture du mucus [10].



**Figure 12: Hybridation in situ sur coupe de caecum de rat. A** coloration au Dapi – Fluorescence des noyaux des cellules épithéliales, **B** hybridation in situ - sonde EUB hybride toutes bactéries **1**.



**Couche adhérente exempte de microorganismes, 2** Couche lâche externe en contact avec la lumière fluorescence des bactéries hybridées. **3 Largeur de la muqueuse Photo au microscope à épi fluorescence** Travail personnel (Flore dossou-yovo)

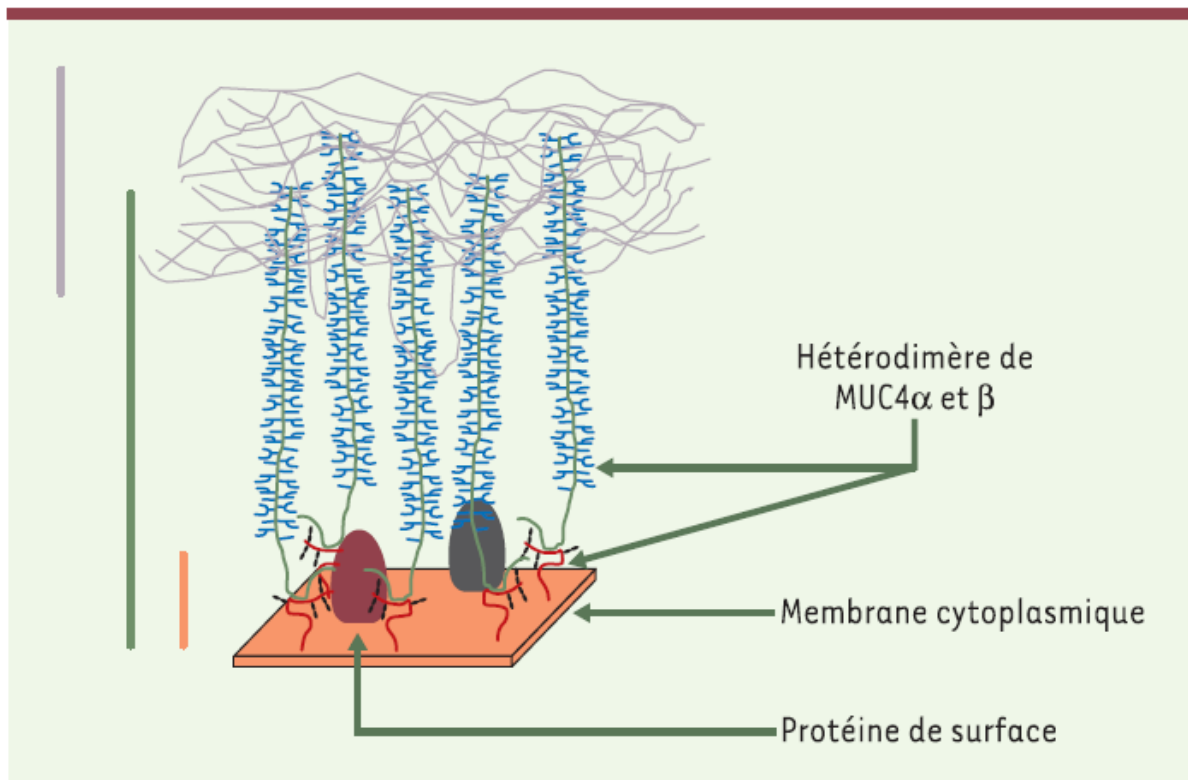
**Sur le plan moléculaire :** Les travaux de 1960-1990 ont permis la caractérisation physicochimique des chaînes glycaniques et du squelette peptidique, à partir de préparations de mucines purifiées d'espèces variées de mammifères. Leurs séquences peptidiques déduites sont organisées selon un même schéma structural: masse moléculaire élevée (*pouvant atteindre plusieurs millions de Da, sous forme polymérique, MUC2 présent dans le grêle et le côlon, est un large polymère de taille supérieure à 100 MDa*), richesse en chaînes O-glycaniques (60% à 80% du poids sec), richesse en proline, thréonine, sérine (20% à 55% de la composition en acides aminés), présence de vastes domaines glycolysés résistant à la protéolyse et, enfin, existence de courtes régions « nues » libérées par protéolyse [6]. *Les mucines sécrétées solubles* chacune un domaine caractéristique et spécifique, le domaine **TR**, (**T**andem **R**epeated amino acid sequence), constitué d'unités répétitives de séquences d'acides aminés potentiellement O-glycosylables [6]. Grâce aux nombreux résidus cystéine de la partie amino-terminale, elles formeraient des oligomères puis des multimères responsables de la formation du réseau tridimensionnel du gel de mucus [91].

*Les mucines membranaires* A cause de leur point de clivage, le domaine « SEA » élaboré pour être rompu, ces mucines peuvent être détectées en grande quantité dans la couche fluide du mucus et ce, sans destruction de la membrane [80]. Elles contribuent aux propriétés physicochimiques et biologiques, même si elles sont dépourvues des domaines peptidiques responsables de l'assemblage tridimensionnel du gel de mucus. Ces molécules chargées négativement de conformation rigide et étirée dépassent largement au pôle apical l'ensemble des molécules du glycocalyx [6, 83, 92] (Figure 13).

### 2.1.2.3. Les fonctions du mucus

L'une des fonctions importantes du mucus est le **maintien de l'hydratation** dans les voies respiratoires, le long du tube digestif. Pour une meilleure biodisponibilité orale le mucus de l'épithélium gastro-intestinal riche en eau, reste le milieu à travers lequel s'opèrent les premières diffusions hydrophile et hydrophobe des molécules nutritionnelles, des principes actifs et des toxines en provenance du milieu extérieur [80, 93].

Le mucus a des actions **antioxydantes, anti-protéolytiques, et antimicrobiennes** [79]. Aussi, les mucines sécrétées sont considérées d'une part comme des acteurs importants dans le système de **réparation** des épithéliums lésés [73, 94] et de protection des épithéliums, par les mécanismes **d'hydratation, de lubrification, de piégeage des microorganismes** [95], par ailleurs, les protéines transsudées ou excrétées contenues dans le mucus ont soit une fonction **anti-infectieuse**: IgA, Lysozyme, peroxydase, transferrine, lactoferrine, défensine, soit jouent le rôle **d'inhibiteurs de molécules** contre les agressions « non infectieuses » : inhibiteurs de protéases, glutathion, catalases, et contre toutes agressions d'origine endogène ou exogène (sucs digestifs, polluants, toxines, etc).



**Figure 13 : Mucines membranaires et protection cellulaire.** (Porchet et al. 2004) Ce schéma montre une première ligne de défense (trait vertical gris) constituée par le gel de mucus (mucines sécrétées du complexe 11p15) pouvant inclure des formes sécrétées d'autres mucines. Une deuxième ligne de défense (trait vertical vert) est constituée par les mucines membranaires. MUC4 est représentée à la surface cellulaire sous la forme d'une structure hétérodimérique comportant un domaine MUC4 de type VNTR (variable number of tandem repeats), représenté en vert, et un domaine MUC4 associé à la membrane, représenté en rouge. Ces deux domaines sont liés de façon non covalente. La taille de MUC4 varie entre 1,2 et 2  $\mu\text{m}$  selon les individus. Le trait vertical orange délimite le glycocalyx, d'une épaisseur estimée à 10 nm.

Les fonctions de **maintien de l'intégrité**, de **restitution et de réparation des cellules**, d'**inhibiteur d'apoptose** et de **barrière** du mucus sont en partie assurées via les protéines Fc-gamma binding protein » (FCGBP), Trefoil Factor Family TFF3, et Resistin-like Molecule  $\beta$  (RELM  $\beta$ ) contenues dans le mucus et sécrétées par les cellules caliciformes, comme nous l'avons développé dans la partie qui traite les autres protéines qui composent le mucus.

Des études menées par différents auteurs confirment que le mucus joue non seulement le rôle de protection de l'épithélium mais constitue une **barrière sélective** [68, 73, 84]. Cette notion de barrière est d'autant plus évidente quand on sait que la lumière intestinale foisonne de microorganismes commensaux comme pathogènes en contact ou en provenance du chyme, et que ce même épithélium doit assurer le transport de certains nutriments. Ce sont le glycocalyx et le mucus adhérent qui séparent le microbiote intestinal (contenu dans le mucus fluide) des cellules épithéliales. Par ailleurs, l'idée selon laquelle le mucus serait un piège, un



filtre ou un écran protecteur inerte paraît correspondre à une notion trop restrictive du concept de protection épithéliale [6, 83]. Le mucus n'est pas seulement **barrière physique** statique, mais aussi **barrière dynamique** de protection car il est en permanence renouvelé et secrété dès que la muqueuse est balayée, détruite ou attaquée par une invasion de microorganismes pathogènes [83]. De par sa structure et sa composition il est aussi attribué au mucus la fonction de **récepteur de surface** et **d'activateur des signaux intracellulaires** et ce, grâce aux mucines transmembranaires dont la partie C-terminale est ancrée dans la cellule. La partie N-terminale en dehors de la cellule participe à la composition du gel de mucus ; elle sert de récepteur de signaux de l'inflammation ou de toutes formes de stress qu'elle transmet à l'intérieur de la cellule [96, 97]. Dans le cas de la destruction de l'intégrité cellulaire (inflammation, ischémie, stress) les cellules épithéliales peuvent perdre leur polarité, interviennent alors les mucines transmembranaires qui se déplacent aux pôles basolatéraux des cellules et s'associent aux récepteurs Tyrosine Kinases (RTKs), et développent des processus pour la réparation et la survie des tissus [96].

Il semble bien que les propriétés de protection requièrent la mise en œuvre de processus intégrant le concept d'homéostasie épithéliale et sont indissociables des fonctions d'échanges, d'informations des cellules épithéliales, et des mécanismes de renouvellement de l'épithélium. C'est dans cette logique que Johansson et son équipe soulignent que la compartimentation du mucus en deux couches distinctes, (l'une fluide et riche en microorganismes, l'autre ferme stérile et protectrice) est fondamentale pour l'homéostasie du côlon fortement colonisé par les microbes [98].

Notons aussi que la perte de la barrière, en particulier de la couche interne adhérente conduit à des inflammations et au développement du cancer du côlon [38, 99, 100], de même qu'à une augmentation de la perméabilité intestinale.

#### 2.1.2.4. Les propriétés physico-chimiques et biologiques du mucus

Si des interrogations subsistent encore au niveau de la structure du réseau formé par le mucus, les propriétés rhéologiques et leurs effets sur la perméabilité sont mieux étudiés. La rhéologie est une branche des sciences physiques qui étudie l'écoulement de la matière et les déformations suivies par plusieurs corps sous l'action des forces qui agissent sur eux. Ce terme introduit en physique et en chimie par Bingham et Crawford en 1929, est connu des biologistes depuis les années 1901. Il s'applique au mucus qui est un gel visqueux, élastique et capable de s'étirer, d'où ses propriétés de viscosité, de viscoélasticité, de filance etc.

Les mucines contribuent aux propriétés du mucus. Sur le plan rhéologique elles sont responsables de la **viscoélasticité et de la filance** (capacité d'étirement). Cette propriété de viscoélasticité peut être compromise par la réduction des liaisons disulfures ou par la protéolyse [101]. Les domaines riches en cystéine comportant des domaines C-terminaux et CK (Cystein Knot) apparaissent comme des modules qui favorisent la **polymérisation** nécessaire pour la formation des macromolécules

[73, 84, 85]. Ces polymères possèdent des propriétés **d'adhérence** [95], mécanisme qui provient des interactions électrostatiques dues aux charges négatives de surface des cellules et positives des particules. Cette muco-adhésion peut s'accroître grâce aux interactions hydrophobes des domaines riches en phospholipides, aux interactions van der Waals, et aux interpénétrations formées par les chaînes polymériques [102]. Par ailleurs, les propriétés **tensio-actives** des mucines sont à l'origine du caractère de **stabilisateur d'émulsion**, ce qui explique l'effet de ces macromolécules sur les autres constituants du mucus et sur leur rôle de formation de gel.

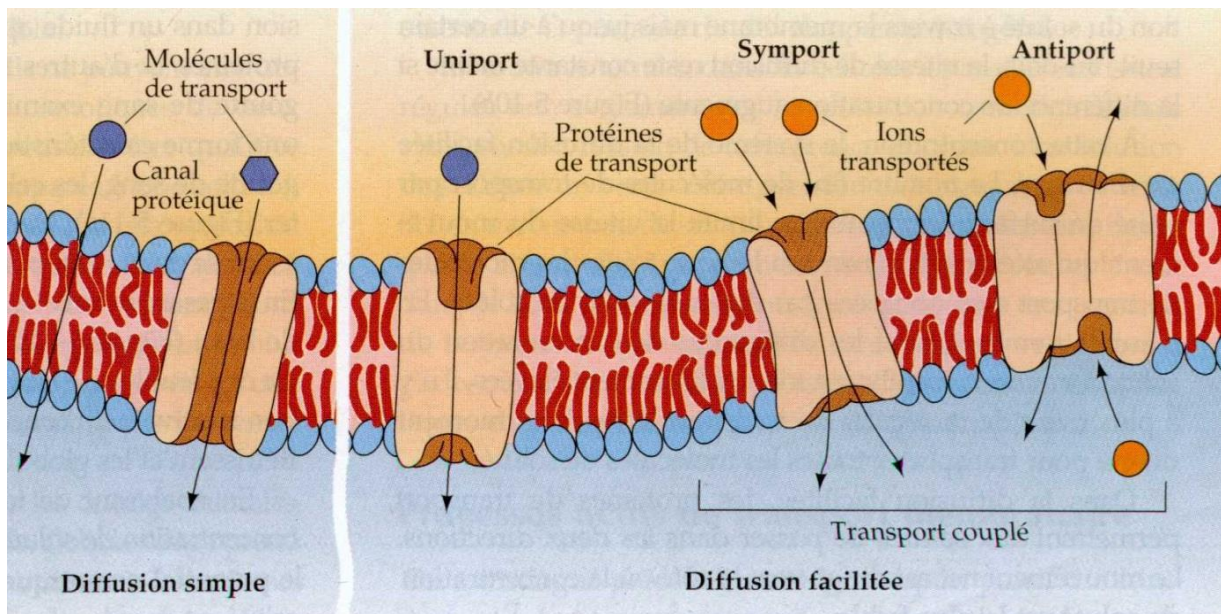
Pour certains auteurs, les propriétés **hydrophobes** du mucus gastro-intestinal semblent être liées aux constituants lipidiques et en particulier aux surfactants phospholipidiques qui sont synthétisés, stockés, et sécrétés par les cellules à mucus [61, 103]. Dans la cellule muco-sécrétrice et les cellules de sa lignée, il semble exister une propriété de **coordination d'expression et vraisemblablement de fonction** entre mucines sécrétées et mucines membranaires. Sur des modèles cellulaires en culture, le blocage du trafic intracellulaire des mucines sécrétées entraîne une expression compensatrice de mucines membranaires [104].

En conclusion les couches de mucus intestinales interviennent et participent à l'installation des bactéries commensales et à la colonisation par les microbes pathogènes. Des déficiences au niveau des mucines ou des propriétés rhéologiques défectueuses conduisent à une fonction de barrière défaillante, à un système immunitaire adaptative, le tout permettant le développement de maladies inflammatoires ou des lésions qui influent sur la perméabilité intestinale [38, 73, 100].

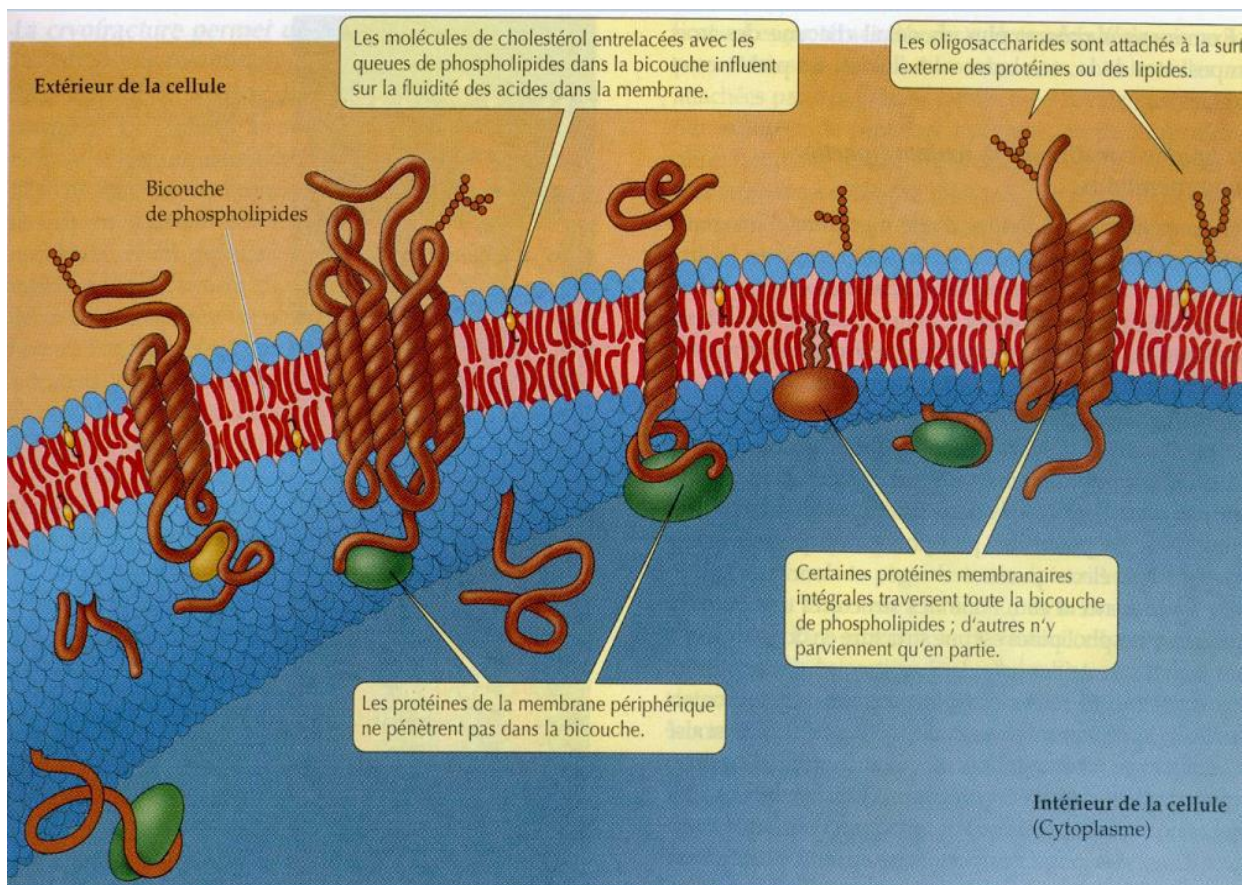
### 2.1.3. La membrane plasmique: sa structure et ses fonctions

La membrane plasmique est aussi bien impliquée dans le processus de transport des molécules que les couches de mucus. Elle représente la structure qui délimite les voies de passage entre les cellules ou à travers la cellule. Elle est formée d'une double couche phospholipidique et protéique présentant un milieu hydrophobe particulièrement imperméable aux ions et aux molécules polarisées. Cependant, la cellule a besoin à la fois d'ingérer des nutriments nécessaires à sa survie et d'éliminer des déchets métaboliques, raisons essentielles pour lesquelles elle s'est construit des systèmes de transport membranaires assurés par des protéines transmembranaires : les *protéines porteuses*, ou perméases, et les *canaux ioniques*.

La membrane plasmique délimite le volume cellulaire, en maintenant ainsi l'interface entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire, et également entre le cytoplasme et le milieu de chaque organe intracellulaire délimité par une membrane interne.



**Figure 14 A Protéines membranaires de transport** (Purves *et al.* 2000)



**Figure 14 B Protéines membranaires de transport** (Purves *et al.* 2000) Traité de biologie - Le monde du vivant. W.K. Purves and al. Médecines Sciences Flammarion éd. 2000

La différence de potentiel crée ainsi que l'existence de gradient ionique, permettent à certaines protéines transmembranaires spécialisées de synthétiser de l'ATP, source d'énergie utile pour le transport de solutés ou pour transmettre des signaux électriques vers les centres nerveux ou musculaires.

### **2.1.3.1. Les Protéines membranaires de transport**

Entrant dans la composition de la membrane, les protéines sont soit transmembranaires, soit cytosoliques. Certaines protéines membranaires sont responsables du transport passif ou actif des molécules. D'autres servent de capteurs ou de récepteurs de signaux extérieurs transmis à la cellule pour lui permettre de se modifier en réponse à l'environnement (Figure 14 A et B).

Parmi ces protéines transmembranaires nous pouvons en citer de manière non exhaustive:

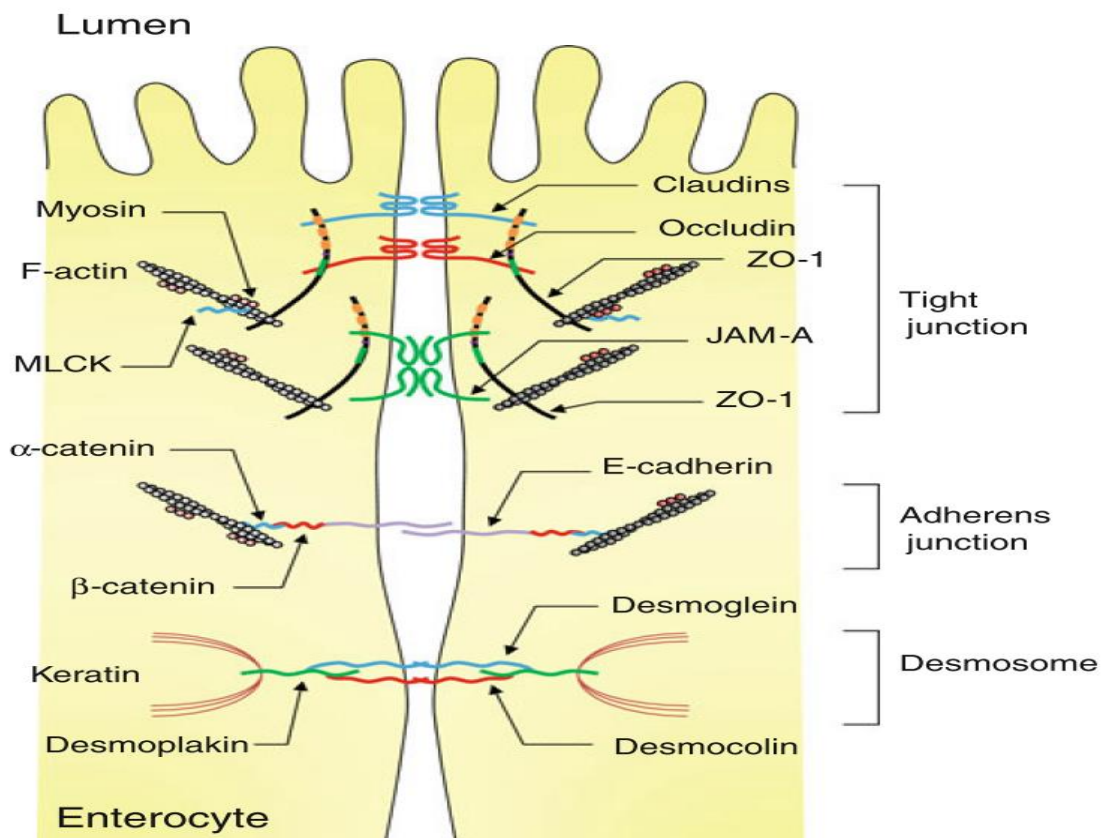
- Les transporteurs de peptides PEPT1 [105], co-transporteurs de 707 acides aminés, fonctionnant en symport avec le cation  $H^+$ . Ils sont situés sur la face apicale des entérocytes. Ont été identifiés: le HPT1 (*Human Peptide Transporter1*), le PTR3 et le PHT1 (*Peptide/Histidine Transporter*).
- Les transporteurs mono-saccharidiques, comme les transporteurs de glucose identifiés, sont de plus en plus nombreux, notamment ceux qui sont appelés SGLT [29], numérotés de 1 à 6 (SGLT1, SGLT6). Les transporteurs de glucose de la famille des GLUT comptent plus de treize membres. Dans les entérocytes, le SGLT1 sert au transport couplé de  $Na^+$  et glucose (ou galactose) [106]. Le GLUT2, situé sur la face basolatérale, permet le passage du fructose, du galactose et du glucose ; sur la face apicale, le GLUT5 transporte du fructose.
- Les transporteurs de cations organiques OCTN1 et OCTN2 (*Organic Cations Transporters*), que l'on trouve sur la face apicale des entérocytes et qui sont des transporteurs antiports de  $Na^+$  [107], spécifiques du transport de la carnitine.
- Les transporteurs d'anions organiques (*OAT et OAT-polypeptides*) ; les OATP sont présents dans de nombreux tissus, y compris l'épithélium intestinal [108].
- Les protéines membranaires de surface intercellulaires ou intracellulaires de signalisation ( *$Na^+/H^+$  Exchange Regulator Factor*, NHERF). À ce jour, quatre protéines NHERF ont été identifiées et clonées. Elles sont localisées dans la bordure en brosse des cellules épithéliales de l'intestin (NHERF1, NHERF2, NHERF3 et NHERF4) [109]. Les jonctions serrées présentent une dynamique et une structure multi-protéique, sélectivement perméables aux petites molécules hydrophiles [110, 111].
- Les protéines impliquées dans les jonctions cellulaires sont aussi transmembranaires et cytosoliques; elles seront citées dans le paragraphe ci-dessous où les différentes sortes de jonctions sont décrites.



### 2.1.3.2. Les jonctions intercellulaires

Les jonctions cellulaires qui permettent de relier les cellules entre elles ou les cellules à la matrice cellulaire, exercent aussi des fonctions importantes dans le contrôle du passage des xénobiotiques (protéines polypeptides); par ailleurs elles assument différents rôles de soutien de la cellule et ce selon leurs différentes structures. L'élaboration et la compréhension de leur mécanisme de fonctionnement permet de grandes avancées en pharmacologie. La modulation des jonctions serrées est à présent utilisée comme nouvelle approche pour l'amélioration de l'absorption des marqueurs ou des médicaments hydrophiles à faible biodisponibilité [112, 113]. La surface totale d'échanges de l'épithélium intestinal est estimée à environ  $2.10^6 \text{cm}^2$ , la surface paracellulaire évolue dans l'intervalle de 200 à 2000  $\text{cm}^2$  [114, 115]. Par rapport à la voie transcellulaire, la surface paracellulaire totale accessible passe de 0.01% [116] à une valeur de 0.1% [47].

La classification des jonctions détermine deux catégories: les jonctions imperméables et les jonctions d'ancrage (Figure 15).



**Figure 15 Structure moléculaire de la jonction intercellulaire des cellules épithéliales de l'intestin.** Ces jonctions sont composées de différents complexes protéiques à savoir les jonctions serrées (Tight junction), les jonctions adhérentes (Adherens junction), et les desmosomes. Les jonctions serrées constituent un assemblage de protéines transmembranaires et intracellulaires [117] (Takuya Suzuki 2013)

#### 2.1.3.3. Les jonctions imperméables (*tight junctions*)

Les jonctions imperméables, encore dites «jonctions serrées» ou «jonctions étanches », sont très nombreuses dans l'épithélium de l'intestin grêle. Localisées vers la région apicale des cellules, elles sont composées de complexes multiprotéiques transmembranaires et intracellulaires. Elles ont un rôle de barrière et une perméabilité sélective à travers les feuilletts cellulaires épithéliaux. Elles agissent comme :

- barrières de diffusion des protéines membranaires porteuses, de la surface apicale vers le domaine basolatéral de la cellule ;
- barrières sélectives des ions inorganiques, de la lumière intestinale vers la matrice extracellulaire ;
- barrières sélectives des ions hydrosolubles entre deux cellules voisines.

Elles empêchent également, la rediffusion des molécules ayant bénéficié du transport transcellulaire, de repartir vers la lumière.

Cette imperméabilité n'est pas absolue, surtout en ce qui concerne l'épithélium de l'intestin grêle, qui laisse passer des ions inorganiques tels que le  $\text{Na}^+$  et les petites molécules hydrosolubles ou lipophiles comme les médicaments. Les boucles extracellulaires qui assurent la perméabilité sélective proviennent des protéines transmembranaires comme l'occludine, les claudines les JAMs et les tricellulines.

#### 2.1.3.4. Les jonctions d'ancrage (*anchoring junctions*)

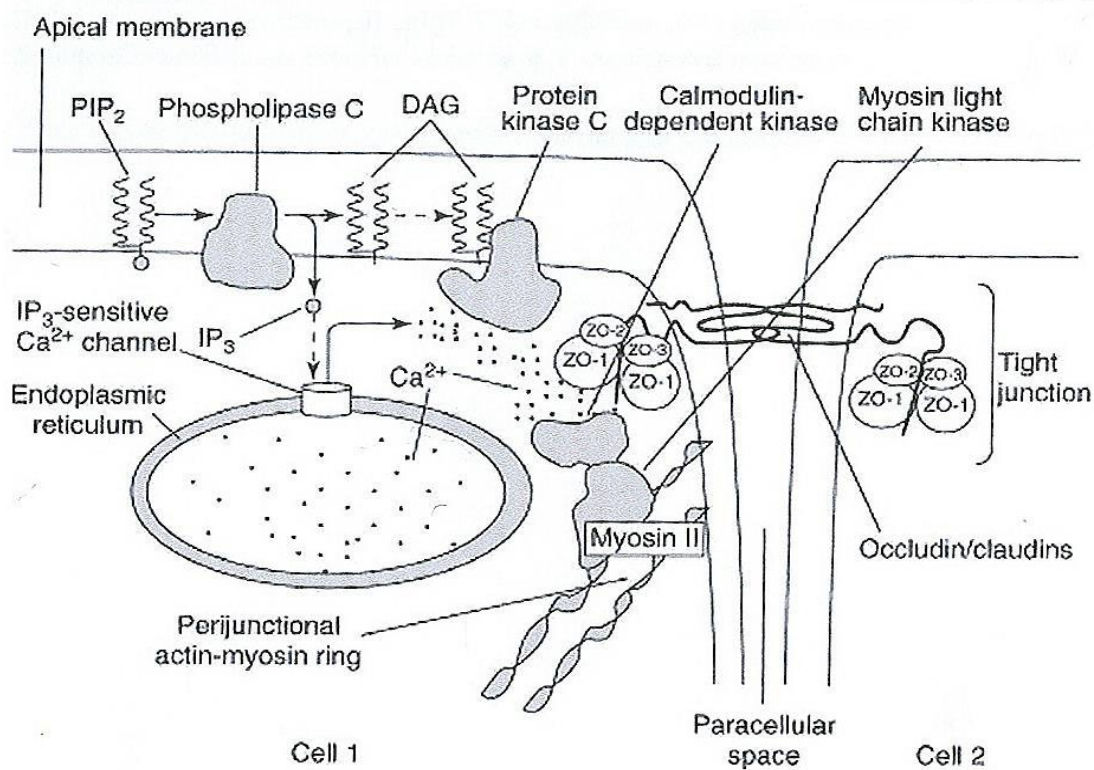
Les jonctions d'ancrage permettent de renforcer la technostucture des cellules, notamment celles qui sont le plus soumises à de fortes tensions, comme les cellules musculaires. Ce sont des sites de liaison ancrés aux filaments d'actine ou aux filaments intermédiaires intracellulaires. On distingue:

- les jonctions adhérentes, (*adherens Junction*) (Figure 15). La principale molécule d'adhésion constituant les jonctions adhérentes est la cadhérine qui permet de connecter deux cellules adjacentes au moyen d'interactions homophiliques,  $\text{Ca}^{2+}$  dépendantes[118]. Les E-cadherine sont ancrés au cytosquelette d'actine via l'interaction avec les betas et alpha catenines.
- les *desmosomes*, situés entre deux cellules, se composent de deux plaques denses d'un point de vue électronique, présente dans chacune des cellules. Ils contiennent des protéines issues de trois familles différentes, on distingue ainsi : la *desmoplaquine* qui joue le rôle de lien entre les filaments du cytosquelette et les plaques desmosomales ; les *cadhérines* (desmogléine et desmocolline) qui traversent la membrane cellulaire ; des protéines de la famille des *armadillo* (*plakoglobine* et *plakophiline*).

**Leshémidesmosomes.** La cohésion de l'ensemble de la barrière est assurée par des interactions entre les cellules épithéliales et la lame basale et ce, grâce aux hémidesmosomes. De même structure que les *desmosomes*, ces *hémidesmosomes* sont situés au pôle basal et permettent l'ancrage des cellules à la lame basale.

Les protéines impliquées dans le passage à travers les jonctions sont [110, 111]:

- l'occludine dont l'état de phosphorylation joue un rôle important dans la régulation des jonctions étanches;
- les claudines sont des composants essentiels des filaments de jonctions serrées;
- les protéines associées aux jonctions serrées (TJAP – tight junctions-associated proteins), sont au nombre de trois, ZO-1 (Zona Occludens), ZO-2 et ZO-3 (Figure 15).



*Pharmaceutical Science & Technology Today*

**Figure 16 Les Voies de signalisation et de modulation des jonctions serrées : rôle de la phospholipase C.** (Ward P. et al. 2000). La figure doit se lire comme suit : l'activation de la protéine trimérique G par un récepteur activé (non montré sur le schéma) stimule la phospholipase C (PLC), qui catalyse la dégradation du phosphatidyl-inositol (4-5) biphosphate (PIP2) en diacylgcérols (DAG) et en inositol 1,4,5-triphosphate (IP3), qui sont des messagers secondaires ; le diacylgcérol (DAG) active la protéine kinase C (PKC), qui phosphoryle les protéines des jonctions serrées ; c'est l'ensemble du  $\text{Ca}^{2+}$  fixé sur la calmoduline après libération par le réticulum endoplasmique et du DAG qui active la PKC. L'ensemble calmoduline-PKC phosphoryle et stimule l'activité de la chaîne myosine kinase (MLCK) laquelle provoque la contraction des anneaux périfonctionnels d'actine et de myosine ; étant reliés à la membrane, ces anneaux provoquent la modification des jonctions serrées par leur contraction.

Le mécanisme régulant l'activité des jonctions serrées devient de plus en plus explicite, grâce aux nombreux travaux effectués dans ce domaine en pharmacologie et surtout à l'investigation soutenue de la recherche de modulateurs de jonctions (Figure 16). Les modulateurs de jonctions sont de plusieurs types : des agents chélateurs de calcium, des surfactants, des chaînes moyennes d'acides gras, des sels biliaires, des polymères cationiques et des esters de phosphates ou de d'acides gras [110].

### **2.1.3.5. Les canaux ioniques**

Les canaux ioniques forment des «pores» hydrophiles transmembranaires. Cependant, ce ne sont pas de simples pores ; ils s'ouvrent en présence d'un stimulus qui les contrôle. Ils présentent une sélectivité ionique liée au diamètre de leurs pores et à la taille de la molécule (un filtre). Ils transfèrent des ions inorganiques suivant le gradient électrochimique de l'ion et possèdent une vitesse de transport mille fois supérieure à celle des protéines transporteuses [119, 120].

Les canaux des jonctions de type Gap, qui sont des prolongements de membranes et de cytoplasmes entre deux cellules adjacentes, sont très fluides et peu sélectifs [67].

## **2.2. Les barrières biochimiques : les enzymes et les pompes**

Les molécules et les principes actifs subissent parfois l'action des nombreux enzymes localisées dans le glycocalyx et la bordure en brosse. Leur métabolisation est une stratégie d'élimination mais de rares fois, il arrive qu'une fraction de la molécule active produise un métabolite oxydé capable de dénaturer l'enzyme, d'inhiber son action et d'induire des protéines reconnues immunogènes.

De nombreuses molécules antimicrobiennes formées par les cellules de Paneth ou les cellules B de la *lamina propria* sont présentes dans le mucus. Des mécanismes de détoxification sont aussi assurés par les cellules qui par l'intermédiaire des pompes d'efflux ATP-ases dépendantes rejettent des composés nocifs à l'extérieur.

### **2.2.1. Les enzymes**

- *Les enzymes de phases I* : Les cytochromes P450 (CYP) se trouvent au niveau de l'intestin. Cette superfamille des CYP 450, comptent les CYP 1A1, CYP 1A2, CYP 2D6, CYP 3A4, CYP 2C9 et CYP 2C19. La sous famille la plus représentée est celle



des CYP3A. Le CYP 3A4 fait 60 % des enzymes CYP situées au niveau des entérocytes. Il métabolise un grand nombre de composés et limite ainsi leur absorption [121]. Il est inductible et métabolise un grand nombre de substrats par des réactions d'hydroxylation et de N-déalkylation [122].

- *Les enzymes de phases II* : Celles qui sont exprimées par les entérocytes sont notamment des aminopeptidases, les dipeptidylpeptidases IV, cinq endopeptidases proviennent du pancréas: trypsine chymotrypsine, élastases, carboxypeptidases [123]. On trouve également des acétyltransférases, des glutathion S-transférases, des méthyltransférases, des sulfotransférases et des UDP- glucuronyltransférases [121].

Dans le mucus, en provenance des cellules de Paneth, sont secrétés des composants antimicrobiens qui sont des molécules comme les  $\alpha$  défensines, cathélicidines, lysozymes, angiogénine 4, phospholipase A2 sécrétrices, collectine, histatine, et des lectines tels REGIII  $\alpha$  (connu sous le nom de HIP et PAP) et REGIII $\gamma$  [18, 19]. Les anticorps secrétés IgA et IgG par les cellules B et rejetées dans le mucus par les cellules épithéliales rappellent la fonction protectrice [124]. Notons que dans ce mélange de fluides, interviennent aussi un certain nombre d'enzymes bactériennes (commensales comme pathogènes) [125], dans le côlon en particulier des enzymes de dégradation de la mucine, principale source de carbone et d'énergie des bactéries, et de dégradation des déchets non métabolisés [88].

### 2.2.2. Les pompes ATP-ases et les canaux

- *La pompe  $Na^+/K^+$*  (ATPase sodium-potassium dépendant), refoule en permanence, le sodium à l'extérieur de la cellule dans le sens contraire du gradient de concentration et fait entrer du  $K^+$ .
- *Les pompes à efflux* : sont des protéines dites « transporteur ABC » dont les caractéristiques fonctionnelles sont liées à des propriétés biochimiques : a) elles possèdent toutes un domaine nommé « cassette de liaison de l'ATP » (*ATP Binding Cassette*); b) elles ont la particularité de transporter des molécules hydrophobes (dont les médicaments) et certaines de l'intérieur des cellules vers l'extérieur ; c) certaines transportent des acides aminés, des oses, des ions inorganiques dont le cholestérol, des peptides, des polysaccharides et même des protéines.

Leur concentration ou surexpression a des conséquences sur l'absorption; la plus connue est la pompe « P-glycoprotéine » (P-gp), codée par le gène de résistance pléiotropique aux drogues: le gène MDR (multidrug resistance protein)[126]. Il s'agit d'une famille de gènes très homologues comprenant deux gènes chez l'être humain (MDR1 et MDR3) et trois gènes chez les rongeurs (MDR1A, MDR1B et MDR2). L'expression seule de la MDR1 chez l'être humain, des MDR1A et MDR1B chez les rongeurs confère les propriétés de multi-résistances aux médicaments anticancéreux [126, 127]. La P-gp, pompe à efflux, transmembranaire, ATP-ase énergie dépendante, joue un rôle physiologique majeur dans l'absorption, la

distribution et l'excrétion des xénobiotiques. Sa fonction de barrière biochimique consiste à limiter l'entrée des xénobiotiques et à jouer un rôle d'aspirateur afin de purger les différents organes ou la circulation systémique [128]. La P-gp possède de nombreux substrats, en général des composés hydrophobes neutres ou chargés positivement [129], appartenant à la classe pharmacologique des anti-arythmiques, des antibiotiques, des antifongiques, de la chimiothérapie contre le cancer, des hormones, des inhibiteurs de protéases du HIV, des immunosuppresseurs etc. Certains marqueurs fluorescents sont aussi reflétés [128].

Par ailleurs, la protéine 2 associée à la résistance multiple aux médicaments (MRP2, MultiDrug Resistance-associated protein 2) transporte des composés hydrophiles comme le glutathion. La protéine de résistance au cancer du sein (BCRP, Breast cancer resistance protein encore nommée ABCG2), reconnaît les anticancéreux hydrophiles [129]. Tous ces systèmes d'efflux sont présents au niveau du pôle apical des cellules épithéliales intestinales [130].

Les progrès en biologie moléculaire ont permis d'approfondir nos connaissances concernant la localisation, de la structure, et du mécanisme d'action de la P-gp; de ce fait le développement de nouvelles techniques de modulation de cette pompe, et la découverte d'un panel d'inhibiteurs de P-gp, conduisent à l'amélioration de l'absorption intestinale des médicaments (Drugs) ingérés par voie orale [128]. En somme, l'évaluation de la perméabilité par voie paracellulaire ou transcellulaire est fonction des effets ou actions possibles générés par ces barrières physiques et biochimiques. Cette évaluation ne peut se faire aussi sans tenir compte des caractéristiques physicochimiques des xénobiotiques.

### **1.3. La notion de flux et de perméabilité membranaire**

Les protéines membranaires insérées dans la double couche de phospholipides sont des molécules porteuses de charges électriques et sont donc capables de conduire du courant. Cette propriété fait valoir l'existence d'une conductance membranaire ou d'une opposition au passage du courant électrique, qui correspond dans ce cas à une résistance membranaire transversale. Ces deux paramètres très variables sont liés directement à la quantité de protéines incluses dans une portion de membrane.

En milieu aqueux, les charges électriques sont portées par des ions. On en déduit que la différence de concentration de part et d'autre de la membrane (d.d.p), est génératrice d'une des formes d'énergie dont a besoin l'organisme. Ainsi, au repos (sans stimuli), la membrane est traversée par des flux ioniques suivant une force électrochimique qui est la résultante de la force osmotique et de la force électrique. Ce mouvement confère à la membrane un caractère d'hémi-perméabilité. La perméabilité d'une membrane n'est pas seulement due aux forces électrochimiques, mais aussi à sa physiologie, qui met à disposition des protéines hydrosolubles

servant de canaux de transport spécifiques à chaque ion. Une de ses protéines influant sur le flux est la P-gp, très reconnue pour son action d'efflux d'un point basolatérale de la cellule vers un point apical.

Higuchi décrit la perméabilité d'un médicament à travers les multiples barrières comme une addition de séries de résistance identique à un circuit électrique [55, 131]. Zwolinski et ses collaborateurs, suggèrent que l'UWL (couche d'eau et de mucus) doit être considéré comme une résistance indépendante  $R_{UWL}$  formant avec la résistance membranaire  $R_m$ , la résistance totale  $R_T$ .  $R_{UWL}$  regroupe les couches d'eau et de mucus situées de part et d'autres de la membrane coté donneur et côté receveur (Figure 17).

Flynn et Yalkowsky s'inspirent des remarques faites les années précédentes par Zwolinski et décrivent pour l'évaluation mathématique de la perméation d'une molécule à travers une membrane lipophile comportant plusieurs niveaux de barrières, les équations suivantes :

$$R_T = R_{UWL} + R_m \quad (1)$$

Le flux net d'un ion au travers d'une membrane est proportionnel à la perméabilité de la membrane pour cet ion et à la valeur de la force électrochimique. Puisque le coefficient de perméabilité est proportionnel aux résistances nous avons l'équation suivante (2)

$$\begin{aligned} J &= P_T C_v = (R_{UWL} + R_m)^{-1} \cdot C_v \quad (2) \\ &= (1/P_{UWL} + 1/P_m)^{-1} \cdot C_v \end{aligned}$$

D'où:

- J est le flux à travers la membrane plasmique
- $C_v$  est la concentration initiale de la molécule du côté donneur
- $P_T$  est le coefficient de perméabilité totale
- $P_{UWL}$  et  $P_m$  sont respectivement le coefficient de perméabilité des barrières UWL et de la membrane (m). La relation établie entre le coefficient de perméabilité ( $P_T$ ) et le coefficient de diffusion (D) permet d'obtenir théoriquement la valeur de l'épaisseur de la couche d'eau non agitée avec comme équation (3) :

$$\begin{aligned} J &= P_T C_v \quad (3) \\ P_T &= D \cdot K / h \end{aligned}$$

D'où :

- D est le coefficient de diffusion
- K le coefficient de partition entre la phase aqueuse et la membrane
- H est l'épaisseur de l'UWL.

Dans la pratique, *in vitro* le flux unidirectionnel (muqueux-séreux :  $J_{i,ms}$ , ou séreux-muqueux:  $J_{i,sm}$ ) d'un ion ou d'une molécule (i), est la quantité de produit (i) passée à travers la membrane ou un tissu, de surface donnée, par unité de temps; il

est déterminé par le dosage du perméant dans le compartiment receveur à intervalles de temps réguliers. Le flux est calculé selon l'équation suivante :

$$J = (\Delta Q / \Delta t \times A)$$

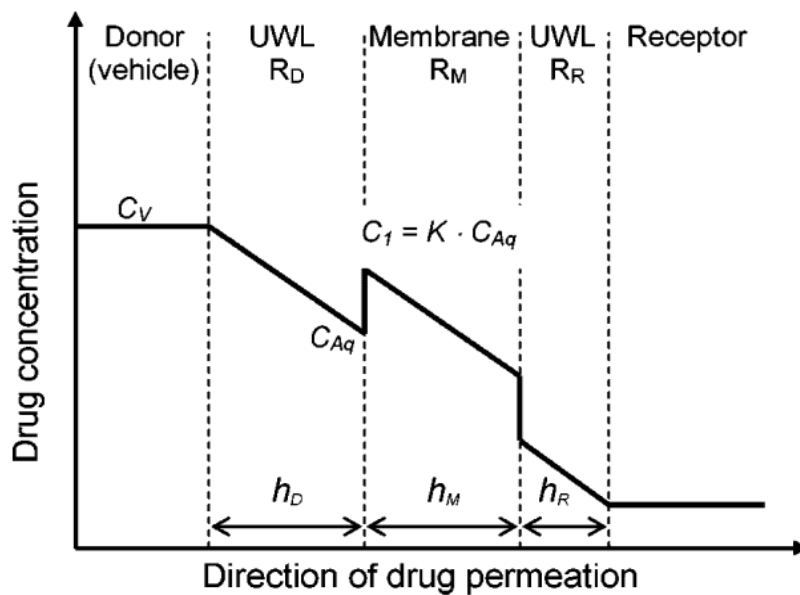
D'où :

$\Delta Q$  = différence des quantités de la substance à étudier en un intervalle de temps

$\Delta t$  = intervalle de temps

A = surface membranaire exposée

J = flux exprimé en quantité des substances transportée par unité de surface tissulaire exposée et par unité de temps



**Figure 17** Schéma de perméation d'un médicament en fonction de la concentration [55]. Trajet à partir de la phase donneur en passant par les couches d'UWL de part et d'autre de la membrane, jusqu'à la phase du côté récepteur.

$C_V$ : concentration initiale du médicament du côté donneur ;

$C_{Aq}$ : concentration du médicament au point de contact immédiat de l'UWL à la surface de la membrane;

$C_1$ : concentration du médicament à l'intérieur de la membrane du côté du donneur;

$K$ : coefficient de partition du médicament entre UWL et la membrane;

$h_D$ : épaisseur de la UWL sur le côté donneur;

$h_M$ : épaisseur de la membrane;

$h_R$ : épaisseur de la UWL sur le côté du récepteur.

$R_D$ ,  $R_M$  et  $R_R$  sont respectivement les résistances à l'UWL au côté donneur, à l'intérieur de la membrane et dans l'UWL au niveau du côté du récepteur.

## **II. Les facteurs qui influencent l'absorption intestinale et/ou la biodisponibilité orale.**

L'administration des médicaments par voie orale reste toujours la méthode la plus utilisée puisque permet un bon suivi thérapeutique et une bonne commodité pour le patient. Tous les facteurs susceptibles de modifier les barrières physiques et biochimiques peuvent également entraîner une modification de la biodisponibilité. En relation avec divers paramètres, les principaux facteurs qui, influent la biodisponibilité orale sont : la concentration du produit, la couche d'eau non agitée, La membrane plasmique et ses composantes et les interactions médicamenteuses.

### **2.1. La concentration du xénobiotique ou du médicament**

Toutefois pour atteindre des concentrations thérapeutiques efficaces lors de l'ingestion par voie orale, la molécule doit posséder des propriétés pharmaceutiques satisfaisantes. Selon le système biopharmaceutique de classification (BCS), le degré d'absorption par voie orale d'un médicament est régie par deux facteurs principaux: la perméabilité effective à travers la muqueuse intestinale et les caractéristiques de solubilité de ce dernier dans le milieu gastro intestinal [132]. Il est fondamental de s'assurer qu'un produit soit complètement dissous puisque sa perméabilité est proportionnelle à la concentration initiale précise du médicament à étudier. Des xénobiotiques peu solubles peuvent dans un milieu aqueux précipiter. La filtration qui permet d'éliminer tout précipité, entraîne en parallèle une baisse de la concentration et une instabilité dans le calcul des résultats, ce qui souligne, une mauvaise reproductibilité. C'est pour cette raison que Kanzer suggère que lorsqu'un produit est partiellement soluble il est difficile en expérimentation *in vitro* d'évaluer la concentration suffisante (initiale) solubilisée dans le compartiment donneur, [133].

L'insuffisance de la concentration initiale peut conduire du côté récepteur à de faible concentration, d'où la nécessité d'utiliser des instruments de mesure munis d'une grande précision avec des seuils de détection très bas. Plusieurs travaux se focalisent de nos jours sur les agents solubilisant endogènes ou non-endogènes comme les sels biliaires, l'albumine sérique bovine (BSA), le DMSO, le chitosan, le méthyl-bêta cyclo dextrine etc., afin d'accroître le nombre des nouvelles molécules thérapeutiques puis de faciliter leur solubilité et leur transport membranaire. Le choix de ces excipients tient compte du modèle *in vitro* choisi et des propriétés physicochimiques de la molécule [132]. A cet effet de nombreux systèmes-modèles combinant dissolution et perméabilité ont été développés. [134-136]. Le taux de

solubilité constitue un obstacle pour la perméabilité [137-141]. Pour une meilleure biodisponibilité orale le circuit du médicament est donc conditionné par différentes phases :

### **Phase de mise à disposition**

C'est la phase où le principe actif doit se dissoudre dans le tractus gastro-intestinal. Plusieurs autres facteurs conditionnent cette dissolution et peuvent entraver l'efficacité du produit, tels le pH du milieu, la formulation du produit (forme solide, liquide, effervescente, sel, acide), la taille des particules solides. Une substance ne peut être résorbée que sous forme dissoute, *faisant de la phase de dissolution un facteur limitant de la résorption.*

### **Phase de passage intestinal**

La molécule peut franchir la barrière intestinale, compte tenu de ses caractéristiques physicochimiques, en empruntant soit la voie paracellulaire, soit la voie la transcellulaire. Elle peut subir un transport passif, actif ou facilité. Des modifications physicochimiques de la substance médicamenteuse peuvent se faire au contact de sécrétions digestives de protéines divers (cytochromes P450, enzymes pancréatiques, enzymes bactériennes, enzymes de la bordure en brosse ou pompe à efflux, point développé plus haut).

### **Phase de circulation systémique**

La quantité de principe actif qui atteint la circulation générale après une administration orale est appelée la biodisponibilité systémique. De l'intestin en passant par la veine porte la substance active subit un premier passage hépatique puis, véhiculée par le sang veineux vers le cœur puis les poumons, elle est propulsée dans la circulation systémique. Par l'intermédiaire du sang périphérique, la molécule est distribuée vers d'autres tissus, organes dont les reins. Suivent les phases, de distribution et d'élimination.

#### **2.1.1. La couche d'eau non agitée (UWL)**

En pharmacologie, Sugano suggère que la perméabilité de la membrane intestinale est un processus séquentiel de la couche d'eau non agitée (UWL) et de la perméation de la membrane épithéliale [36]. Il définit sous le terme « UWL » l'ensemble de film d'eau et de mucus constitué de deux couches de mucus par ailleurs définit par Atuma [37, 58]. L'épaisseur de la couche de mucus est conditionnée par la balance entre le taux de sécrétion et le taux de dégradation et de desquamation [80]. Il est aussi fonction de l'activité digestive de la région inspectée, du régime alimentaire plus ou moins riches en fibres, de l'espèce et des différentes méthodes et techniques de mesures utilisées pour l'évaluation [40, 142].

Mesurée *in vivo* sur des rats Wistar mâles, à partir de l'estomac jusqu'au côlon, Atuma et son équipe donne une vision très claire sur la disparité de l'épaisseur de la couche de mucus, lesquelles dépendent du segment du tube digestif mesurée. Selon ce groupe de chercheurs, dans le côlon du rat, les deux couches de mucus donnent la valeur la plus extrême soit un total de  $830 \pm 110 \mu\text{m}$  dont  $714 \pm 109 \mu\text{m}$  pour la couche supérieure moins ferme [37] (Figure 9). Tout cet ensemble oppose une résistance à la diffusion importante des xénobiotiques hydrophobes (biphényles polychlorés) dissous en graisses alimentaires [143]. Aussi, par leurs travaux, l'équipe de Liboshi et d'autres auteurs, concluent que la maturité de la couche de mucus et l'augmentation de son épaisseur dans le TGI, constitue, l'un des facteurs important qui participe à la restriction de la perméabilité intestinale [42]. Théoriquement les restrictions de diffusion dues à la présence d'eau non agitée sont estimées à partir du coefficient de diffusion et de l'épaisseur de cette couche UWL [144]. Chez les souris déficientes en *MUC2*, l'absence de cette physiologie (UWL) dûe au non développement des cellules à mucus fonctionnelles, explique l'augmentation de la perméabilité épithéliale, la facilité de l'adhérence bactérienne épithéliale, l'apparition de colites spontanées et leur prédisposition à la RCH induite par le DSS [38, 73, 100].

Une fois les mucines libérées des vésicules enfermées dans les cellules caliciformes, et vidées à la surface des cellules épithéliales, elles s'hydratent et prennent du volume, puis forment un réseau complexe, et ensemble avec les autres constituants sécrétés, elles s'organisent en une couche interne bien stratifiée [38]. La viscoélasticité du mucus est contrôlée par l'hydratation [80].

Par ailleurs la modification de la diffusion à travers l'UWL (eau non agitée et mucus), n'est pas seulement fonction de son épaisseur mais relève aussi, des caractéristiques et de l'intégrité des propriétés rhéologiques de ce dernier, en particulier de la régulation de sa viscoélasticité. Chen et ses collaborateurs suggèrent que la présence d'ions  $\text{HCO}_3^-$  dans le mucus diminue la concentration d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  libres et de  $\text{Ca}^{2+}$  liées aux mucines et permet un «gonflement» de la couche de mucus soit une augmentation de l'hydratation [145]. La concentration d'ions ( $\text{HCO}_3^-$ ) modifie la viscosité [146] et donc influe sur la perméabilité. De plus, la diminution de la perméabilité est corrélée avec l'augmentation du degré d'ionisation [147]. Autrement dit la transition de l'état de solution du mucus gastrique à l'état de gel, s'effectue lorsque le pH est bas, ce qui est dû aux liaisons croisées d'interactions hydrophobiques des mucines. La diminution du coefficient de diffusion s'accompagne d'une diminution du pH, ce qui permet de suggérer une augmentation de la taille hydrodynamique de ces macromolécules [148].

L'étude protéomique et biochimique révèle qu'en plus des mucines, le mucus renferme une gamme très variée de protéines, mais aussi d'autres paramètres qui influent sur les propriétés rhéologiques et ou fonctionnelles tels: l'hydratation, la concentration en ions, en ADN, en lipides [57, 66].

La composition en types de mucines et la glycosylation modifient les propriétés rhéologiques du mucus [83, 149]. Ces mucines et la glycosylation varient avec l'âge,

le régime alimentaire, la présence et les activités d'antigènes spécifiques, de microorganismes commensaux et pathogènes [149].

Les peptides trifoliés (TFF3) protéines secrétées par les cellules en gobelets, impliquées dans les liaisons non-covalentes avec les mucines [8, 150], forment avec la FCGB des hétéromères qui se fixent sur les MUC2, pour ainsi modifier les propriétés biophysiques et protectives du mucus, par augmentation de la viscosité [8, 67, 73, 151].

D'autres constituants tels, L'ADN qui représente 0,02% de la masse de mucus et provient des débris et de la desquamation des cellules épithéliales [152, 153], les protéines immunoglobulines A et M (IgA et IgM) issues des cellules B de la *lamina propria* et libérées aussi par les entérocytes [124, 154, 155], enfin les phospholipides permettant les liaisons entre dimères, font accroître la viscosité du mucus et complexifient son réseau.

### **2.1.2. La membrane plasmique et ses composantes**

Comme indiqué précédemment la membrane plasmique épithéliale détermine la surface d'échange qu'occupent les différentes voies de passage ; sa perméabilité est fonction, du nombre, et de l'expression de ses constituants. La déplétion et la dérégulation des éléments liés à sa structure, et à son bon fonctionnement, entraînent la modification de son intégrité, et de son rôle de barrière [38, 73, 100]. La perméabilité intestinale est fonction de la fluidité et de l'intégrité membranaire [156], et elle dépend aussi de la nature et des caractéristiques physicochimiques des xénobiotiques au contact de la membrane plasmique.

Des auteurs ont suggéré qu'il existe un lien entre la composition lipidique des membranes et leur fluidité [157], de même il a été établi sur différents échantillons (singe, homme, poulet) que, la partie distale du jéjunum est plus fluide que le segment proximal [158-160]. Masaoka et son équipe suite aux expériences menées sur des rats parviennent au même résultat par segment et considèrent que les différences de la fluidité membranaire contribuent à l'augmentation de la perméabilité du Naproxen dans le côlon.

Au vu des produits testés sur différents segments du TGI, ces chercheurs suggèrent que ni les variations de surfaces d'échange (jéjunum, côlon), ni les pores innées des jonctions (rayons identiques du jéjunum au côlon), ne sont des facteurs déterminants pour ces différences de perméabilité observées; elles sont dues à la fluidité de la membrane et à l'épaisseur de la couche de mucus [156]. Des toxines microbiennes secrétées perturbent l'intégrité épithéliale par l'induction de processus comme la lyse, l'apoptose, l'inhibition ou l'arrêt du cycle cellulaire, la perturbation des jonctions étanches intercellulaires et la modulation des signaux inflammatoires [83]. Ce processus de perturbation de l'intégrité membranaire est à présent un outil très précieux utilisé pour l'amélioration de la biodisponibilité orale. L'usage de modulateurs des jonctions serrées comme les fragments peptidiques ou



enterotoxines zonula occludens toxin (Zot) élaboré par *vibrio cholera* [113, 161], le chitosan et ses dérivés, les sels biliaires [162, 163] les acides gras, les esters, les agents tensioactifs, les surfactants anioniques, à une concentration donnée, réduisent par divers mécanismes la résistance électrique transepithéliale (TEER) de la membrane qui engendre l'ouverture des jonctions et l'augmentation de la perméabilité paracellulaire [110, 147].

D'autres moyens de régulation et d'amélioration de la perméabilité intestinale membranaire consistent en l'application des inhibiteurs de la P-gp protéine membranaire jouant un rôle important dans la biodisponibilité orale [128]. Peu recouvert de mucus, le dôme épithélial qui recouvre les plaques de Peyer permet aux cellules M de saisir le microbiote pathogène intestinal, mais cette ouverture peut servir de porte d'entrée aux bactéries en cas d'invasion. La déficience de l'enzyme bêta 1,3-N-acetylglucosaminyl-transférase [98] et (ou) le manque de l'enzyme bêta 1,6-N-acetylglucosaminyl-transférase, qui permettent la O-glycosylation des noyaux des polymères de mucines [164, 165], altèrent l'intégrité de la barrière muqueuse, augmentent la perméabilité et favorisent la translocation bactérienne et la prédisposition au RCH induite par le Dextran Sodium Sulfate (DSS).

### **2.1.3. Les interactions médicamenteuses**

Les interactions médicamenteuses représentent un volet important en pharmacologie et font l'objet de plus en plus d'études. Bien que d'énormes progrès scientifiques et thérapeutiques aient été effectués dans le diagnostic et la prise en charge des maladies comme le syndrome de l'immunodéficience acquise ou du cancer, du paludisme, les pratiques thérapeutiques de certains pays consistent à combiner le traitement par les médicaments conventionnels et celui par les 6 plantes médicinales. Les interactions multiples et parfois inattendues, doivent être signalées et suivies, raison pour laquelle, les études sur l'utilisation des médicaments et les services pharmaco-épidémiologiques sont étroitement liés aux travaux des comités pharmaceutiques et thérapeutiques (Drugs and Therapeutics Committees - DTCs) et à l'assurance qualité du traitement médicamenteux dans les hôpitaux cliniques [166, 167].

Les interactions entre médicaments peuvent soit, rendre le médicament de traitement principal moins efficace, soit provoquer des effets secondaires non répertoriés ou soit augmenter l'action d'un des médicaments. Certaines interactions médicamenteuses peuvent être dangereuses pour la santé par exemple, Le Ginkgo (*Ginkgo biloba*) combiné avec un diurétique thiazidique provoque l'hypertension artérielle, lorsqu'il est associé au trazodone suscite le coma [168]. Les interactions médicamenteuses peuvent être pharmacodynamique ou pharmacocinétique. Pharmacodynamique quand l'interaction s'applique à l'effet pharmacologique du médicament sur son site d'action. Pharmacocinétique quand il relève des processus de l'absorption, du métabolisme, de l'excrétion ; L'interaction pharmacocinétique d'un médicament par une plante implique par exemple la modulation des

cytochromes ou de la P-gp. Ceci peut induire une augmentation ou une diminution de la biodisponibilité du médicament.

En fonction de la nature de la molécule active et de son site d'action, nous pouvons différencier les catégories d'interactions suivantes :

#### **2.1.3.1. Les interactions entre médicaments «drug-drug»**

L'interaction médicamenteuse est notifiée quand les médicaments administrés dans la même période produisent des signes cliniques ou pharmacologiques différents de ceux escomptés lorsque l'usage des médicaments est individuel.

Prenons l'exemple des antirétroviraux de la classe des inhibiteurs nucléosidiques de la Transcriptase inverse (INTI): la stavudine et la zidovudine sont des antagonistes et ne doivent pas s'utiliser en même temps [169].

Parmi les antirétroviraux de la classe des inhibiteurs de protéases (IP) virales, des études cliniques ont approuvé la combinaison adéquate de l'Atazanavir (ATV) lorsqu'il est Co-administré avec le saquinavir (SQV) [170]. Un autre inhibiteur de protéases le Ritonavir (RTV) est associé au deux précédents pour ses qualités connus de promoteur de la potentialité des IP et forme la trithérapie ATV/SQV/RTV; lors de ces combinaisons il est très important d'ajuster et de respecter les doses [171]. Le Ritonavir, utilisé comme « booster » activateur des IP en l'occurrence de l'Atazanavir, améliore la biodisponibilité en inhibant le Cytochrome P450 (CYP) 3A et la P-gp [169, 172, 173].

La Rifampicine est le traitement idéal contre le *Mycobacterium tuberculosis*. En cas de coinfection avec le VIH, le traitement concomitant de la Rifampicine et des ARV provoque une interaction qui diminue la biodisponibilité de l'Efavirenz (EFV) un inhibiteur non nucléosidique de la transcriptase reverse (INNTI), ou de l'IP, Atazanavir. Il est alors important de revoir pour régularisation efficace les doses des ARV administrées [174]. Ces interactions médicamenteuses sont très référencées et étudiées, dans le but de découvrir de nouveaux substrats comme inhibiteurs d'efflux ou effecteurs d'influx pour l'amélioration de la biodisponibilité orale.

#### **2.1.3.2. Les interactions plantes médicaments «herb-drug»**

Dans les pays en voie de développement, les traditions ancestrales de soins à base de plantes, restent toujours d'actualité. Proche de la nature, la vertu des plantes est transmise de générations en générations, ce qui dans le temps, a permis à ces pays, de mettre au point la pharmacopée (recensement de plantes à vertus). Malgré les prodigieuses avancées en médecine conventionnelle, ces soins par les plantes ne sont pas négligées et de nos jours acquièrent une reconnaissance mondiale officialisée sous le terme de phytothérapie, et ce par deux organismes importants l'organisation mondiale de la santé (OMS) et l'organisation africaine de la propriété intellectuelle (OAPI). Du point de vue analyse éthique, Tilburt et son équipe

soulèvent des problèmes particulièrement difficiles pour la recherche internationale en phytothérapie: la valeur sociale, la validité scientifique et le ratio risque/bénéfice favorable [175]. Ces difficultés soulignées n'influent pas dans les pays en voie de développement, puisque la phytothérapie reste la médecine préférentielle de bon nombre de gens et ce, pour les raisons suivantes: les effets secondaires sont moindres que ceux de l'usage des produits en médecine allopathique; Les coûts du traitement sont faibles comparés à ceux de la médecine conventionnelle ou ceux des produits bio similaires ou biologiques; le développement des produits biologiques et bio-similaires conduit à plus d'incertitude en ce qui concerne les moyens financiers de la population [167].

Bien que largement utilisées, les effets et les interactions présentés par ces nombreuses plantes entre elles ou associées au produit de la médecine conventionnelle, ne sont pas encore tous élucidés en pharmacologie. Pour cette raison, l'Agence européenne des médicaments (EMA) fait la promotion de monographies communautaires de plantes médicinales ou de produits afin, d'évaluer leur innocuité et l'efficacité cliniques [176, 177]. Suite aux investigations de recensement d'interactions cliniques significatives, et à des reports de cas une liste d'interactions herb-drug a été dressée et repris par plusieurs auteurs [167, 168, 178-180]. Nous présentons quelques exemples dans le Tableau (N°2).

Pour procéder à ces tests de biodisponibilité soit de perméabilité il existe plusieurs modèles et techniques d'évaluation.

Plantes	Médicaments	Interactions Effets cliniques
<i>Allium Sativum</i> (ail)	Paracetamol Wafarin Chlorpropamide Saquinavir	Modifie variable pharmacocinétique Baisse la concentration sanguine Provoque une hypoglycémie Augmente la concentration sanguine
<i>Ginkgo Biloba</i> (ginkgo)	Wafarin Acetylsalicylic a. Trazodone thiazide	Provoque des saignements Provoque des saignements Provoque le coma Augmente la concentration sanguine]
<i>Panax Ginseng</i> (ginseng)	Wafarin Alcool (éthanol)	Baisse la concentration sanguine Baisse la concentration sanguine
<i>Scutellaria baicalensis</i>	Irinotecan (cancer)	Améliore la toxicité de ce produit chez les patients atteints de cancer
<i>PiperMethysticum</i> (kava)	Levodopa Alprazolam	Plus de période « off » parkinsonien Provoque le coma
<i>Piper nigrum</i> Linn or <i>P. longum</i> Linn	Rifampicine Propanol theophylline	Plasma concentration chez tuberculeux Augmente l'AUC Augmente l'AUC
<i>Hypericum perforatum</i> (St john's wort)	Cyclosporine loperamide Digoxin Carbamazepine	Provoque des saignements Provoque des saignements Réduit la concentration sanguine Sans effet
<i>Citrus Paradisi</i> (pamplemousse)	Plusieurs médicaments (flavonoids)	Modifie variable pharmacocinétique Augmente la biodisponibilité en inhibant le CYP3A4 ou la P-gp

**Tableau 2 : Interactions Herb – Drug et effets cliniques** [166] [176] [177] [178] [179]

### **III. Les différents modèles et techniques de mesures de la perméabilité intestinale**

#### **3.1. Les méthodes de mesure de la diffusion à travers la muqueuse**

D'une manière générale, en pharmacologie, la perméabilité intestinale se définit par l'aptitude de la particule, du médicament, de la molécule active à traverser la barrière épithéliale. Elle peut se mesurer au moyen de différentes méthodes et techniques appliquées sur l'animal vivant, sur des fragments de tissu ou d'organes *in vivo*, *in situ* ou *in vitro*.

##### **3.1.1. *In vivo***

###### **3.1.1.1. La perfusion intestinale**

La perfusion intestinale a pour objet de mesurer la perméabilité et le métabolisme d'un produit actif par le biais de cathéters insérés dans le tube digestif dans la lumière intestinale d'un animal anesthésié. La solution introduite par un cathéter traverse une dizaine de centimètres de l'intestin et elle est recueillie par un autre cathéter pour analyse.

###### **3.1.1.2. *In vivo* et *in situ*: l'anse isolée**

La technique est utilisée sur rat anesthésié. Des segments d'intestin sont ligaturés et les veines mésentériques cathétérisées. L'administration du médicament est faite dans la lumière intestinale. À intervalles de temps réguliers, des prélèvements sont effectués dans la veine cathétérisée et dans le segment ligaturé. Afin de compenser la perte de sang lors des prélèvements, du sang de rats donneurs témoins est injecté dans la veine jugulaire. Par cette technique, il est possible d'évaluer la biodisponibilité des xénobiotiques en fonction du territoire intestinal, ainsi que la fraction métabolisée dans la lumière intestinale par les cellules entérocytaires [45].

L'avantage de cette technique est la viabilité à long terme du tissu puisque l'étude est menée *in vivo*. Elle donne le reflet exact de la fraction absorbée dans un site donné sans faire intervenir les difficultés d'interprétation liées au métabolisme hépatique quand les études sont réalisées selon les méthodes de pharmacocinétique classique. On peut évaluer la perméabilité effective du médicament administré. Cependant, l'inconvénient majeur est la difficulté de maintenir l'animal en vie durant une période suffisamment longue, nécessaire lors de l'expérimentation.

### **3.1.1.3. *In vitro***

Les anneaux ou sacs inversés [181]. Il existe deux types de techniques d'intestins isolés et retournés:

- les anneaux utilisant des segments de 1 ou 2 cm (anneaux retournés),
- les anneaux utilisant des segments de plusieurs centimètres (sacs retournés).

Il s'agit de segments d'intestin prélevés, retournés et fermés aux deux extrémités en présence d'un tampon oxygéné. Ainsi, la surface muqueuse est présentée vers l'extérieur. Les sacs sont placés dans un tampon également oxygéné contenant le médicament. Il est alors possible d'étudier le passage intestinal. On peut également introduire le médicament à l'intérieur du sac à l'aide d'une seringue pour des études de sécrétion.

La technique est facile à réaliser et relativement rapide. L'étude de l'absorption et de la biodisponibilité est possible, ainsi que l'accumulation du médicament dans le segment. C'est une méthode adaptée à la mesure du passage de molécules faiblement perméables puisque le volume du segment est relativement réduit, évitant la dilution du principe actif.

Il faut tout de même maintenir une oxygénation importante pour la viabilité du tissu. Cependant, les cellules perdent rapidement leur morphologie et il ne reste environ que de 50% à 75% de cellules intactes après trente minutes.

Les Cellules isolées: Des entérocytes sont isolés après traitement de la muqueuse intestinale animale par une méthode mécanique (rotation, broyage), de chélation par EDTA ou par une méthode enzymatique (collagénase). Les cellules sont généralement incubées ou cultivées à court terme (plusieurs jours) dans un milieu glucosé pour les maintenir en survie, en suspension ou sur des boîtes contenant du collagène. La technique permet l'étude de l'accumulation et du métabolisme des principes actifs, mais non du transport. Il semble que ces cellules perdent rapidement leur polarité [47]. La durée de vie de ces cellules étant assez limitée, il est nécessaire de réunir des conditions opératoires très strictes : présence de cofacteurs, adhérence sur certains supports, d'où une reproductibilité relativement faible. En revanche, l'isolement d'entérocytes à différents niveaux de l'intestin est possible.

Les Cellules en culture : Un autre moyen d'utiliser des cellules isolées est de se servir de cellules immortalisées en culture afin d'obtenir des systèmes polarisés, fiables, reproductibles et d'emploi facile. Présentons brièvement trois modèles de cellules issues de cancers du côlon humain utilisées comme types d'épithélium intestinal : les lignées T84, HT29 et CaCo-2.

- La lignée T84

Les cellules T84 issues d'un adénocarcinome colorectal humain, présentent une morphologie semblable à celles des cellules caliciformes. Ces cellules ne possèdent pas de mucus, mais elles peuvent en sécréter après stimulation par des sécrétagogues connus pour la sécrétion de chlore [54–56,182]. Elles sont utilisées pour tester l'effet de certains produits biologiques ou biochimiques sur le canal chlore situé sur leur face apicale.

- La lignée HT29

Cette lignée est constituée en majorité par des cellules indifférenciées, non polarisées sous forme d'une multicouche épithéliale. Moins de 5 % des cellules sont capables de se différencier en cellules polarisées. Les cellules peuvent se différencier selon certaines conditions de culture soit en cellules transporteuses d'ions, soit en cellules à mucus, ou encore en entérocytes.

On peut sélectionner les sous-populations entérocytaires en remplaçant le glucose par le galactose, par exemple. L'épithélium formé possède, au bout d'une dizaine de passages, des caractéristiques morphologiques (bordure en brosse) et biochimiques (enzymes et transporteurs) comparables à celle des entérocytes non cancéreux, à laquelle sont associées les enzymes hydrolases [46].

L'étude du transport de xénobiotiques est possible avec ces sous-populations de cellules. Néanmoins, la culture de la lignée est difficile à maîtriser ; la particularité de la différenciation de ce modèle explique que ces cellules soient moins utilisées pour les études du transport.

- La lignée CaCo-2

Les cellules CaCo-2, issues d'un adénocarcinome de côlon humain (homme caucasien de 72 ans), sont capables de se différencier de façon spontanée dans des conditions de culture standard, c'est-à-dire sans ajout d'agent chimique particulier. Mises au point par Fogh [183] ensemencées sur filtre de polycarbonate, elles arrivent à confluence au bout de quelques jours et forment une monocouche épithéliale polarisée ressemblant à l'épithélium cylindrique simple de l'intestin. Leurs caractéristiques morphologiques, biochimiques et fonctionnelles se rapprochent de celles des entérocytes non cancéreux.

Les cellules CaCo-2 possèdent, au terme de leur différenciation, une bordure en brosse bien développée assimilable à celle que l'on observe dans l'intestin. La cohésion intercellulaire est assurée par le système de jonctions classique, comprenant des jonctions serrées fonctionnelles. Leur résistance électrique transépithéliale se rapproche de celle du côlon: de 150 à 400 ohms/cm<sup>2</sup>.

Des cellules de ce type expriment certaines enzymes de la bordure en brosse, mais aussi des isoformes du cytochrome P450, comme le CYP4501a1, des enzymes de

phase 2, telles la glutathion-S-transférase, la sulfotransférase ou la glucuronidase [125].

Par ailleurs, certains systèmes de transport actif présents dans les cellules normales sont retrouvés sur la membrane des cellules CaCo-2, tel le transport des acides aminés, des dipeptides et des vitamines. Les propriétés morphologiques, biochimiques et fonctionnelles de la lignée rendent possible l'étude du transport des molécules dans le sens basolatéral - apical et apical-basolatéral.

#### **3.1.1.4. Les chambres d'Ussing**

Les chambres d'Ussing encore appelées chambres de perméation, représentent un système *in vitro* actuellement utilisé à grande échelle dans l'étude du transport de molécules à travers différents tissus. Nous développerons un peu plus cette technique, utilisée dans la réalisation du présent projet. Ces dispositifs permettent en effet une approche tissulaire plus complète qu'une culture entérocytaire.

#### **PRINCIPE**

Une préparation intestinale est montée entre deux demi-chambres en plexiglas déterminant un compartiment muqueux et un compartiment séreux.

Les demi-chambres, dont l'ouverture est appliquée contre la surface exposée du tissu intestinal, sont perforées en compartiments contenant le liquide de Ringer, une solution tamponnée à pH = 7,6 thermostatée à 37 °C. Le pH du liquide de Ringer et sa saturation en oxygène sont maintenus constamment par un bullage permanent de carbogène, mélange gazeux composé d'oxygène et de dioxyde de carbone dans la proportion de 95 %/5 % (O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>). Le bullage assure également le brassage permanent du milieu d'incubation dans les deux compartiments. Représentation schématique de la chambre d'Ussing (Figure 18).

La technique décrite permet d'étudier quantitativement le passage d'une substance de concentration connue à travers la paroi intestinale. On introduit la substance à étudier dans un des deux compartiments et l'on effectue dans l'autre compartiment des prélèvements séquentiels de volume connu que nous analyserons.

La chambre d'Ussing permet simultanément de mesurer en permanence les paramètres électriques caractéristiques de la préparation intestinale : la différence de potentiel (ddp) et le courant de court-circuit (I<sub>cc</sub>), grâce à un appareillage appelé clamp de voltage.

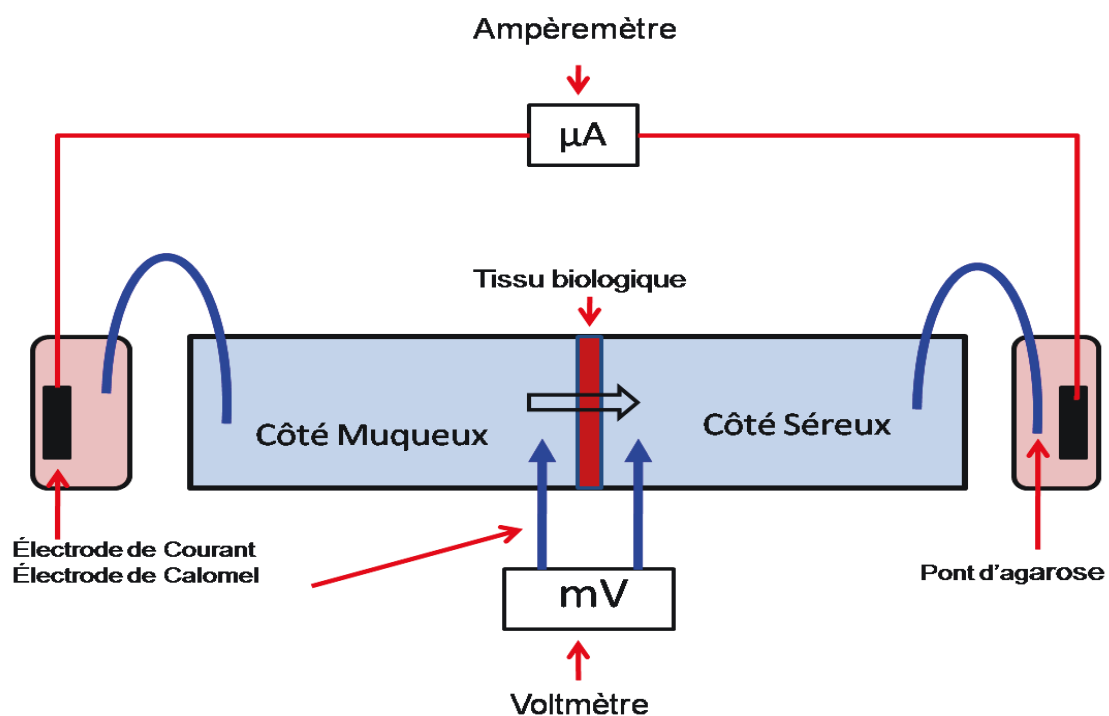
Afin de mesurer correctement les paramètres électriques caractéristiques du tissu intestinal étudié, avant le montage de la préparation intestinale et en présence de liquide de Ringer, il est nécessaire de compenser, grâce au clamp, les résistances

du système (fluide et jonctions électriques), car cette dernière a une valeur du même ordre de grandeur que celle de la résistance du fragment intestinal.

En circuit ouvert, la différence de potentiel du tissu intestinal (exprimée en millivolts) reflète l'asymétrie des charges électriques de part et d'autre du fragment intestinal. Elle est mesurée par un millivoltmètre grâce à deux électrodes de calomel reliées aux deux demi-chambres par deux ponts d'agar saturés en KCl baignant dans les compartiments muqueux et séreux opposés.

La ddp spontanée tissulaire est annulée en fermant le circuit à l'aide d'électrodes en argent connectées à un microampèremètre et reliées aux demi-chambres par deux autres ponts d'agar. On mesure ainsi un courant de court-circuit ( $I_{cc}$ ) exprimé en microampères par unité de surface intestinale exposée.

La chambre d'Ussing permet d'évaluer l'intégrité physicochimique du segment intestinal analysé, car, dans un tel système in vitro, on peut appliquer à l'épithélium intestinal la loi d'Ohm



**Figure 18 : Schéma du principe de chambre de perméation d'ussing. (Bruno ETO 2011)**

Le passage intestinal des électrolytes est quantifié en termes de flux qui est exprimé en quantité de substance transportée par unité de surface intestinale exposée et par unité de temps



Après installation du système, un temps de stabilisation variable selon le tissu est nécessaire pour que le flux devienne constant. Le courant de court-circuit, encore appelé courant de base, représente la somme des flux ioniques nets au travers de la préparation intestinale. Ce sont principalement les flux nets de sodium, de chlorure et de bicarbonate (dihydrogénocarbonate).

Par convention, une augmentation de la valeur du courant de court-circuit traduit une absorption de cation(s) et/ou une sécrétion d'anion(s) par l'entérocyte.

Dans la pratique, le flux unidirectionnel (muqueux-séreux :  $J_{ims}$ , ou séreux-muqueux :  $J_{ism}$ ) d'un ion ou d'une molécule (i), c'est-à-dire la quantité de produit (i) en nanomole passée à travers la membrane de 1 cm<sup>2</sup> de surface en une heure, est déterminé en dosant le perméant dans le compartiment receveur à intervalles réguliers de temps ( $t_2 - t_1$ )

- pour un soluté en mM/cm<sup>2</sup>/h ;
- pour un ion en  $\mu\text{A}/\text{cm}^2/\text{h}$  ou en  $\mu\text{Eq}/\text{cm}^2/\text{h}$

Le flux est fonction de la concentration du produit (i) dans le compartiment donneur.

Pour comparer les capacités de passage entre des molécules, il faut s'affranchir de la valeur de la concentration (C) en calculant la perméabilité. Certains auteurs l'expriment en termes de perméabilité apparente ( $P_{app}$ ), car un tissu (ou même une monocouche cellulaire) ne peut être assimilé à une membrane idéale dont la structure serait invariable dans le temps et dans l'espace.

#### La perméabilité apparente

La perméabilité apparente ( $P_{app}$ ) est évaluée à partir du flux mesuré à l'état stationnaire. Elle est exprimée en centimètres par seconde (cm/s-1) [125, 184]. On peut écrire :

$$P_{app} = J_i / C$$

$$P_{app} = (\Delta Q / \Delta t) \times 1 / AC$$

où :  $P_{app}$  = perméabilité apparente en centimètres par seconde (cm/s)

C = concentration initiale en produit (i) du milieu donneur en nanomoles/cm<sup>3</sup>

$J_i$  = flux mesuré en nanomoles/cm<sup>2</sup>/h

A = surface exposée du tissu en centimètres carrés

#### Les critères de viabilité de la préparation intestinale

La mesure de la conductance tissulaire en continu durant l'expérimentation grâce au clamp de voltage permet de contrôler en permanence l'intégrité tissulaire. Une préparation intestinale viable est caractérisée par une conductance stable durant l'expérience.

En fin de manipulation, la fonctionnalité du tissu peut se tester au moyen de certains produits chimiques qui agissent sur les transporteurs ou les canaux ioniques membranaires.

Des agents activateurs ou inhibiteurs spécifiques des systèmes de transport membranaires (électrolytes ou molécules) administrés du côté muqueux ou séreux réagissent sur le courant de court-circuit et permettent de vérifier, au terme de l'expérience, l'état fonctionnel de l'épithélium intestinal.

Nous citerons uniquement les effecteurs chimiques que nous avons utilisés au cours de nos travaux.

#### Quelques révélateurs de fonctionnalité

##### *L'IBMX (3-isobutylméthylxantine)*

C'est un inhibiteur de la phosphodiesterase qui dégrade l'AMPc intracellulaire. Cette enzyme inhibée favorise l'augmentation de l'AMPc cytosolique, ce qui induit une élévation du courant de court-circuit par suite de l'activation du canal chlorure apical CFTR [185].

##### *Le carbachol*

Il s'agit d'un stimulateur de sécrétion du chlore Cl<sup>-</sup>. Selon les tissus, il active soit le canal apical H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase (côlon distal), soit le cotransporteur basolatéral Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> (côlon proximal)[186].

##### *La bumétanide*

Administrée du côté séreux, cette molécule inhibe le cotransporteur Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> de la membrane basolatérale et fait donc diminuer le courant de court-circuit [186, 187].

##### *L'ouabaine.*

C'est un inhibiteur du canal apical H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase [186] et de la pompe Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPase du côté séreux [188].

## **PARTIE 2:**

### **Hypothèses et Objectifs**

# I. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

## 1.1. Problématique

L'administration orale des médicaments reste encore de nos jours la voie royale de la prise des médicaments car elle reste moins onéreuse et plus adaptée au confort du patient. Mais, cette voie reste toujours inaccessible à certaines molécules comme les médicaments biologiques et les bio similaires voir certains anticancéreux et antirétroviraux.

Pour rendre la voie orale plus accessible aux médicaments de faibles biodisponibilités, il est important de déterminer les paramètres qui limitent leur transport au travers la barrière intestinale. La Biodisponibilité dépend de la solubilité du principe actif dans le milieu aqueux (concentration dissoute) et de la perméabilité du principe actif au travers de la barrière intestinale.

Pour augmenter la biodisponibilité orale des médicaments, il importe donc de s'assurer que :

**1) la concentration du principe actif dissoute (soluble) est suffisante au niveau du site d'absorption.**

Pour rendre le principe actif soluble, pour avoir la quantité suffisante et nécessaire sur le site d'absorption, plusieurs solutions s'offrent au pharmacologue. Pour les molécules peu solubles, les chimistes peuvent greffer les radicaux qui permettent d'augmenter la solubilité de la molécule en milieu aqueux. Ils peuvent aussi utiliser les produits qui facilitent la solubilisation des certains xénobiotiques comme les acides biliaires.

Pour les molécules dégradables soit par les enzymes gastriques ou intestinales, il existe des formulations galéniques qui permettent de protéger les molécules pour leur permettre d'arriver intactes sur le lieu d'absorption (gélules gastro-résistants, enrobage des comprimés, utilisation des nanocapsules comme les cyclodextrines les composants de la graisse de dauphin etc.). On peut également utiliser les inhibiteurs des enzymes responsables de la dégradation des médicaments (CYP450, etc.).

**2) la quantité de principe actif qui passe la barrière intestinale est suffisante pour induire l'effet biologique escompté.** Pour y arriver, les pharmacologues utilisent les promoteurs de passage des médicaments en agissant soit au niveau du passage par la voie transcellulaire, ou alors par la voie paracellulaire ou les deux. Mais pour atteindre l'épithélium intestinal, le principe actif doit franchir la couche d'eau non agité ou unstirred water layer (uwl). Cette couche d'eau non agité est composée en grande partie par la couche de mucus. Le passage au travers de la couche de mucus peut être un facteur limitant pour le transport transmembranaire des xénobiotiques.

Pour permettre le passage de certaines molécules peu solubles au travers de la barrière intestinale, les pharmacologues utilisent plusieurs stratégies. Nous citons ici les plus utilisées :

a) Pour augmenter le passage des xénobiotiques de poids moléculaires faibles <400 qui passent par la voie paracellulaire, les pharmacologues peuvent modifier le pH, le CO<sub>2</sub>, etc.

b) Pour augmenter le passage des xénobiotiques de poids moléculaire plus grand qui passent par la voie transcellulaire, les pharmacologues utilisent les substrats de la glycoprotéine G (Pg-p). L'un des exemples souvent mentionnés est l'association de l'Atazanavir et du Ritonavir (ATV-RTV). Par ailleurs, certains chercheurs travaillent sur les nano transporteurs, les promoteurs d'absorption des médicaments au travers la barrière intestinale (cyclodextrines, etc.).

## **1.2. Hypothèse de travail**

L'hypothèse de travail consiste à trouver un promoteur de l'absorption intestinale de médicaments à faible biodisponibilité qui puisse agir sur plusieurs paramètres à la fois. Une solution idéale serait d'avoir une composition pharmaceutique et/ou diététique qui augmente le passage des xénobiotiques au travers de la barrière intestinale en agissant à la fois sur la solubilisation du médicament, la couche d'eau non agitée, et le passage au travers l'épithélium intestinal.

Cette composition pharmaceutique et/ou diététique pourrait en même temps qu'elle facilite la solubilisation des molécules peu solubles, augmenter le passage transcellulaire en inhibant l'activité des transporteurs transmembranaires (binding cassette transporter) et en modulant l'ouverture des jonctions serrées, enfin cette composition pharmaceutique pourrait jouer le rôle d'un mucolytique.

## **1.3. Objectifs du travail**

L'objectif principal de ce travail c'est la mise au point d'un promoteur de l'absorption des médicaments de faible biodisponibilité, dénué de toute toxicité.

L'objectif secondaire c'est que ce promoteur d'absorption de médicament puisse agir à la fois sur la solubilisation des principes actifs, la couche d'eau non agitée, les transporteurs transmembranaires et sur la voie paracellulaire pour s'assurer d'une large utilisation.

## **PARTIE 3: Travail expérimental**

# **Brevet N°: FR1300921**

**Déposé le 18 avril 2013**

Composition pharmaceutique ou diététique ayant pour objet l'augmentation du passage des xénobiotiques, des médicaments et des nutriments au travers les barrières biologiques.

**Flore DOSSOU-YOVO, Bruno ETO**



[http://www.homejardin.com/oseille\\_de\\_guinee/hibiscus\\_sabdariffa.html](http://www.homejardin.com/oseille_de_guinee/hibiscus_sabdariffa.html)

## **Composition pharmaceutique ou diététique ayant pour objet l'augmentation du passage des xénobiotiques, des médicaments et des nutriments au travers les barrières biologiques.**

### **Quelques définitions.**

Pour mieux comprendre ce texte il est souhaitable de définir quelques mots et termes qui y sont employés. La majorité de tous les termes et mots employés sont définis dans le le dictionnaire illustré des termes de médecine de Garnier Delamare 28<sup>e</sup> édition.

*Adjuvant de médicament:* Auxiliaire thérapeutique ou produit thérapeutique. Ce sont généralement les produits administrés préalablement à des produits thérapeutiques. En chimiothérapie, ces produits sont administrées avant les anticancéreux.

*Biodisponibilité:* Disponibilité biologique des médicaments comme il est défini dans le dictionnaire illustré des termes de médecine de Garnier Delamare 28<sup>e</sup> édition.

*Bioéquivalence:* La bioéquivalence est l'absence d'une différence significative de la biodisponibilité d'un principe actif à partir d'une forme pharmaceutique équivalente, administrée à la même dose dans des conditions similaires au cours d'une étude appropriée. La bioéquivalence correspond à l'équivalence de la biodisponibilité des médicaments comparés. La notion de la bioéquivalence tolère pour ces critères une certaine différence entre une substance de référence et un générique dans la limite qui séparent un intervalle défini par les autorités de santé.

*Barrières biologiques:* Ensemble des structures qui séparent un compartiment biologique à un autre. Parmi les barrières biologiques on peut citer la barrière intestinale qui sépare le contenu de l'intestin (compartiment muqueux) et sang (compartiment séreux). Les barrières biologiques les plus importantes sont: l'intestin, la peau, la cornée, la barrière hémato-encéphalique, la barrière alvéolocapillaire.

*Excipient:* C'est un véhicule d'un médicament. C'est une substance à laquelle on incorpore les principes actifs pour les rendre facilement absorbables.

*Nutriments:* substance alimentaire pouvant être directement et entièrement assimilée, sans avoir à subir les modifications de la digestion et pouvant être introduite par injection intraveineuse. Exemple : glucose, vitamines, sels minéraux etc.



*Médicament*: Substance ou combinaison de substances présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que tout produit pouvant être administré à l'homme ou à l'animal en vue d'établir un diagnostic médical, restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions organiques.

*Médicament essentiel*: Médicament qui satisfait aux besoins prioritaires de la population en matière de soins de santé. Ces médicaments sont généralement utilisés pour des pathologies prioritaires et sont inscrits sur la liste nationale des médicaments essentiels.

*Principe actif*: Substance qui induit l'effet thérapeutique.

*Traceur biologique*: Encore appelé marqueur biologique ou bio marqueur ou indicateur biologique. Élément permettant de dépister une substance sur laquelle il est fixé. Utilisé pour le diagnostic médical le traceur biologique est une substance dont le dosage permet l'exploration des affections spécifiques. Exemple, marqueur de tumeur, de l'hépatite virale, du métabolisme etc.

*Promoteur ou facilitateur de l'absorption intestinale des médicaments*: substance qui favorise l'absorption intestinale des nutriments, des médicaments ou des xénobiotiques.

*Xénobiotiques* : Produits chimique, ménager ou industriel, étranger à la chimie biologique et se comportant comme un toxique ou un allergène vis-à-vis de l'organisme.

*Sels minéraux*: sont des substances provenant de roches qui entrent dans la composition des organismes et qui sont présents dans l'alimentation animale. Parmi les sels minéraux les plus courants on peut citer: calcium, chlore, magnésium, phosphore, potassium, sodium, soufre.

*Oligoéléments*: aluminium, brome, cuivre, cobalt, fer, fluor, manganèse, molybdène, iode, sélénium, silicium, vanadium, zinc.

*Exploration fonctionnelle*: Ensemble d'examens destinés à explorer les grandes fonctions de l'organisme : les fonctions respiratoires, cardiaques, circulatoire, digestives, reproduction etc.

La présente invention concerne une nouvelle utilisation thérapeutique ou diététique de l'extrait de l'Hibiscus Sabdariffa.

On sait que l'Hibiscus sabdariffa L. appartient à la classe des *magnoliopsida*, à la famille des malvacées, au genre Hibiscus. Les autres noms usuels sont les suivants: Bissap, Dah, Oseille de Guinée. En France on l'appelle également karkadé.

Le Bissap est une plante annuelle, haute de 1 à 2 m. Les feuilles, alternes, sont lobées, quelquefois profondément. Les fleurs, jaune-crème, axillaires, atteignant jusqu'à 7 cm de diamètre; le calice, gamosépale, comportant 5 lobes, est

accompagné de 5 bractées (épicalices); la corolle compte 5 pétales obovales arrondis à leur sommet, avec une tache rouge à la base. Le calice devient accrescent, charnu, après la chute de la corolle. Le fruit, capsule conique, mesure jusqu'à 20 mm de longueur. Espèce paléo tropicale, *Hibiscus sabdariffa* est cultivée dans toutes les régions tropicales du monde.

### **Les usages de la plante**

En Afrique de l'Ouest, et sous le nom principal d'Oseille de Guinée, on emploie les feuilles au goût acidulé comme légume cuit à la façon des épinards, et comme salade à saveur comparable, effectivement, à celle de l'Oseille. Quant aux calices de la variété verte, ils sont utilisés dans la confection de nombreux plats à base de riz, de mil, de poisson, de viande. On trouve d'ailleurs couramment en vente sur les marchés les feuilles en bottes et les calices verts, toujours présentés unis aux fruits. Bien que les calices verts soient réservés essentiellement aux usages culinaires, on reconnaît toutefois que leur introduction dans les préparations alimentaires favorise la digestion et combat la fatigue ainsi que la constipation due à une trop grande consommation de riz. De leur côté, les calices de la variété rose qui se présentent à l'état sec comme de petites languettes charnues de 3 cm de longueur associées par deux ou trois, sont destinés à l'exportation et utilisés localement en médecine populaire sous forme de décoctés aqueux comme diurétique, diaphorétique et cholagogue. Ces boissons sont également considérées comme rafraichissantes et tonifiantes; aussi sont-elles très appréciées des musulmans qui en font une grande consommation pendant le Ramadan. Il y a lieu de signaler en outre que la poudre et le décocté de feuilles sont souvent recommandés en usage externe pour les plaies et les blessures. On peut utiliser l'*hibiscus sabdariffa* avec de la myrtille (*Vaccinium myrtillus*) pour lutter contre l'hypertension et l'hyperlipidémie ou comme colorant alimentaire et dans la préparation des phytomédicaments.

Le déposant a constaté, de façon surprenante, qu'un extrait aqueux de fruits (surtout le calice) et les feuilles d'*Hibiscus sabdariffa* sont utilisables en tant que composition pharmaceutique ou diététique pour augmenter l'absorption intestinale des xénobiotiques, des médicaments, et des nutriments. En utilisant les cultures cellulaires et d'autres barrières biologiques comme la peau, la cornée, la muqueuse buccale, anale et vaginale on peut tout aussi bien augmenter le passage des xénobiotiques, des médicaments et des nutriments. Par conséquent la composition selon l'invention peut aussi bien être utilisée en tant que promoteur de l'absorption des médicaments, des xénobiotiques et des nutriments au cours d'études expérimentales, fondamentales ou appliquées. Cependant, l'application préférée de l'extrait aqueux de d'*Hibiscus sabdariffa* est l'augmentation de la biodisponibilité par voie orale des médicaments notamment les médicaments à faible biodisponibilité orale comme les anticancéreux, les antirétroviraux, les antifongiques, les antibiotiques ou d'autres médicaments qui ont des difficultés à passer la barrière intestinale.

L'extrait aqueux, selon l'invention, peut renfermer en outre une ou plusieurs autres substances naturelle ou chimique comme le bicarbonate de sodium ou tout autre produit semblable utilisables par l'homme de métier et pouvant remplacer ledit extrait aqueux dans une formulation pharmaceutique pour apporter la même fonction ou rôle.

### **Composition d'Hibiscus sabdariffa**

<b>Produits</b>	<b>Partie de la plante</b>
Acides acétique	Fruit
Acide aspartique	Fleur
Acide butyrique	Fruit
Acide citrique	Calice Fleur Fruit
Acide formique	Fruit
acide glycolique	Fleur
Acide malique	Fleur Fruit
Acide oxalique	Calice Fleur Fruit]
Acide propionique	Fruit
Acide tartarique	Calice Fleur Fruit

**Table 1** – Les Acides organiques d'Hibiscus sabdariffa

<b>Produits</b>	<b>Partie de la plante</b>
Acide ascorbique	Fleur Fruit
Acide galacturonique	Fleur
Acide utalonique	Fleur
Acide gallique	Fruit
Acide protocatéchique	Fleur

**Tableau 2** : Autres produits d'Hibiscus sabdariffa

Le déposant a constaté que seule une partie des extraits pouvait favoriser l'augmentation de l'absorption intestinale des xénobiotiques et des médicaments. Parmi les composants les plus efficaces on trouve des composés acides de la plantes. Le tableau 1 résume quelques produits acides identifiés dans l'extrait d'hibiscus sabdariffa.

A ces acides organiques repris ci-dessus d'autres produits ont été identifiés et pouvant être efficaces, seuls ou en synergie, avec les produits du tableau 1. Parmi ces composants, on trouve ceux du tableau 2 et 3:

D'autres plantes renferment les mêmes composés que l'Hibiscus sabdariffa et peuvent jouer le même rôle à l'instar de myrtille (voir tableau 2).

<b>Produits</b>	<b>Partie de la plante</b>
Acide 4-hydroxycinnamique	Plante
Acide acétique	Jus de Fruit
Acide acétique-hex-trans-2-enyl-ester	Jus de Fruit
Acide P-hydroxy-benzoïque	Jus de Fruit
Acide Butyrique-hex-trans-2-enyl-ester	Jus de Fruit
Acide P-hydroxy-benzoïque	Plante

**Table 3 :** Les Acides organiques de myrtille

### **Formes galéniques**

Selon l'invention, la composition peut être présentée sous forme de comprimés, gélules, granulés, sirop ou solution buvable, suppositoire comprenant l'extrait d'hibiscus sabdariffa avec au moins un acide organique contenu dans la plante.

Les hommes du métier connaissent et utilisent différents excipients comme liants ou lubrifiants pour fabriquer les poudres, les granulés ou autres préparations. Des exemples d'excipients qui peuvent être ainsi utilisés selon l'invention sont : le lactose, l'amidon, la dextrine, le phosphate de calcium, le carbonate de calcium, le silicate d'aluminium naturel ou synthétique, l'oxyde de magnésium, l'hydroxyde d'aluminium hydraté, le stéarate de magnésium, le bicarbonate de sodium. D'autres excipients non cités ci-dessus mais qui conviennent également sont décrits dans le « Remington's Pharmaceutical Sciences » par E.W. Martin, et peuvent être utilisés selon l'invention.

Dans ces différentes formulations, et par exemple celles mentionnées ci-dessus, la composition peut aussi être présentée en poudre pour dilution ou sirop. Cette poudre peut ne contenir que les principes actifs. Celle-ci est obtenue par exemple par atomisation, séchage, ou lyophilisation à partir de l'extrait aqueux, d'hydro-alcoolique ou l'extrait par le CO<sub>2</sub>.

Le but de l'invention est donc de proposer une nouvelle composition pharmaceutique et/ou diététique qui augmente le passage des xénobiotiques, des médicaments et des nutriments au travers des barrières biologiques et plus particulièrement au niveau de la barrière intestinale.

Le déposant parvient à ce que l'administration par voie orale (per os) d'une quantité efficace du mélange d'un extrait aqueux d'hibiscus sabdariffa avec ou sans bicarbonate de sodium provoque une augmentation du flux net au travers de

l'intestin de rat. Le flux net ( $J_{\text{net}}$ ) étant la différence entre le flux muqueux séreux ( $J_{\text{ms}}$ ) et le flux séreux muqueux ( $J_{\text{sm}}$ ). On appelle ici le flux, la quantité de produit qui passe au travers de l'intestin de rat. Si le passage se fait de la lumière intestinale vers le sang, on parle alors du flux muqueux séreux.

### Mise en œuvre de l'invention

La mise en œuvre de l'invention peut se faire sur l'action de la préparation selon l'invention sur l'augmentation du passage des médicaments avec une biodisponibilité orale très faible comme les anticancéreux et les antirétroviraux.

Exemples de préparation selon l'invention non limitatifs

Un exemple de préparation simplifiée de l'invention se fait par un mélange de la poudre de l'extrait sec de l'hibiscus sabdariffa obtenu par atomisation ou lyophilisation avec le bicarbonate de sodium selon le tableau 4.

Compositions	Hibiscus Sabdariffa	Bicarbonate de sodium	Solution physiologique
F1	10 g	12 g	500 ml Qsp
F2	5 g	5,5 g	500 ml Qsp
F3	2,5 g	2,20 g	500 ml Qsp

**Tableau 4:** Trois compositions très simplifiées de l'illustration de l'invention

### Essai du principe actif

Par les études sur les organes isolés nous avons montré que la composition pharmaceutique selon la présente invention augmente l'absorption intestinale des anticancéreux comme le cisplatine (Cisp) et l'oxaliplatine (Oxa). D'autre part la composition pharmaceutique selon l'invention augmente également le passage intestinal des autres médicaments ou xénobiotiques à faible biodisponibilité par voie orale comme les antirétroviraux: l'Atazanavir (ATV), l'Efavirenz (EFV) et des molécules comme le dextran (FD4).

La description ci-après montre, à l'aide des chambres de perméation ou chambres d'Ussing, l'effet de la composition pharmaceutique selon l'invention, sur l'absorption intestinale de ces différents produits peu perméables chez le rat.

### Mode de réalisation de l'essai

#### Matériels et méthodes utilisés

#### Produits chimiques

La Bumétanide (outil pharmacologique), le bicarbonate de sodium, le FITC-dextran (4-kDa) proviennent de chez Sigma (St Quentin-Fallavier, France). La composition pharmaceutique selon l'invention a est fabriquée par le laboratoire TBC-TransCell-Lab, Faculté de médecine Xavier Bichat (Paris France). Le cisplatine et l'oxaliplatine nous ont été gracieusement fournis par l'université Paris-Sud, Centres d'études pharmaceutiques, département de physicochimie, pharmacotechnie, biopharmacie, UMR CNRS 8 612, laboratoire du professeur G. Ponchel. L'acide citrique provient de Prolabo (Merck-Eurolab), Paris, France.

Les antirétroviraux utilisés proviennent des laboratoires: Atazanavir (Reyata<sup>®</sup>, Bristol-Meyer Squibb Pharma) et Efavirenz (Norvir<sup>®</sup>, Abbot).

### **Préparation de tissus**

Les rats Wistar sont achetés chez Janvier SA (France) et sont nourris par les aliments standard de laboratoire (UAR, Villemoisson s / Orge, France) jusqu'à la réalisation des études. La nourriture est retirée 18 h avant les expériences, mais les animaux ont l'accès libre à eau potable. Pour les études de l'électrophysiologie, les animaux sont tués par la dislocation cervicale après anesthésie. Des segments d'intestin d'animaux à jeun sont enlevés et rincés du contenu intestinal avec solution du Ringer frais. Tous les animaux sont à jeun et l'estomac vide. Les morceaux de tissus sont ensuite ouverts le long de la bordure mésentérique et sont montés bien aplatis entre les deux demi-chambres Ussing (TBC-Biomécatronics SAS, ZI de Ruitz, France).

### **Études du courant de Court-circuit en chambres Ussing**

La solution du Ringer isotonique contenant l'extrait d'hibiscus sabdariffa selon le tableau 4 est utilisée dans les expériences est cette solution est composée de (en mM) 115 NaCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 1.2 CaCl<sub>2</sub>, 2.4 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 0.4 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Le pH était 7.40 à 37°C.

Une préparation intestinale est montée entre deux demi chambres en plexiglas avec un compartiment muqueux et un compartiment séreux. Ces demi-chambres, dont l'ouverture est appliquée contre la surface exposée du tissu intestinal, contiennent le liquide de Ringer tamponnée à pH = 7,6 maintenues à 37°C et buller en permanence avec le carbogène (mélange gazeux composé d'oxygène et de dioxyde de carbone dans les proportions 95% d'O<sub>2</sub> et 5% de CO<sub>2</sub>). Le bullage assure également le brassage permanent du milieu d'incubation dans les deux compartiments. Le potentiel électrique trans-épithéliale qui l'asymétrie de charges électriques entre le coté muqueux et séreux de la membrane est mesuré par les électrodes de calomel (TBC-Biomécatronics SAS, France) reliées par des ponts d'agaroses plongés dans une solution de KCl 3 molaire. Ces ponts sont placés sur les deux côtés du tissu et sont adaptés à chaque demi-chambre. Le tout est relié à un voltmètre à haute impédance (TBC-Biomécatronics SAS, France).

La différence de potentiel mesurée à l'aide des électrodes de calomels est court-circuitée par un courant de court-circuit (I<sub>cc</sub>) via des ponts d'agaroses contenant du

KCl à 3M et placés dans chaque réservoir. Le tout étant relié à un système de voltage-Clamp (TBC-Biomécatronics SAS, France). Toutes les mesures sont ensuite enregistrées de façon continue sur un ordinateur à l'aide d'un logiciel BiodacqSoft (TBC-Biomécatronics SAS, France). Icc représente la somme des flux d'ions nets transportés à travers l'épithélium en absence d'un gradient électrochimique (principalement  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  et  $\text{HCO}_3^-$ ).

### **Mesure de flux bidirectionnels au travers de l'intestin de rat.**

Après la stabilisation des paramètres électriques des tissus, les différentes chambres d'Ussing sont appariées selon leur conductance afin de réaliser les flux bidirectionnels. La chambre choisie pour effectuer le flux muqueux-séreux ( $J_{ms}$ ) et appariée selon la même conductance avec la chambre qui servira à réaliser le flux unidirectionnel séreux-muqueux ( $J_{sm}$ ). Le flux net est ensuite calculé selon la formule suivante:

$$J_{net} = J_{ms} - J_{sm}$$

Les différents produits utilisés pour mesurer le flux (passage au travers l'intestin de rat) sont introduits à la concentration de 1mg/mL dans le compartiment donneur. Les prélèvements avec remplacement sont ensuite effectués à 0, 1, 2 heure puis congelés jusqu'à la mesure du flux par UV pour les ARV et le FD4 et par l'ICP pour le cisplatine et l'oxaliplatine. Les variations des paramètres électriques sont ensuite relevées puis enregistrés sur l'ordinateur.

### **Statistiques**

Les résultats qui sont montrés sur les figures jointes sont rapportés en moyenne (M) de mesures plus l'écart type ( $M \pm ET$ ). Toutes les déterminations sont faites avec une moyenne d'au moins de 7 morceaux de tissu (n). L'analyse de la variance à une voie suivie du test de Dunnett est réalisée grâce au logiciel GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc. CA 92037 USA).

## Résultats sont:

Figure 1: Enregistrement typique de l'effet de trois compositions selon l'invention (voir tableau 4) sur le courant de court circuit en fonction du temps. La première flèche à 62 min marque l'ajout de la composition (F1 ou F2 ou F3). La deuxième flèche à 135 min marque l'ajout de la Bumétanide dans le milieu séreux. Cet enregistrement montre que l'effet de la composition selon l'invention sur le courant de court-circuit ( $I_{cc}$ ) est dose dépendant.

Figure 2: **A)** -Passage des antirétroviraux (ARVs) seuls au travers de l'intestin de rat en fonction du temps. Cette figure montre que le passage de l'Efavirenz (EFV) est supérieur à celui de l'Atazanavir (ATV). **B)** Le passage des ARVs en présence de la composition selon l'invention (F2). EFV= l'Efavirenz et ATV = Atazanavir. En présence de F2 la cinétique de passage des ARVs est totalement modifiée. Ce résultat montre l'effet de F2 sur la cinétique de passage des ARVs au travers de la barrière intestinale.

Figure 3: **A:** Perméabilité apparente de l'Efavirenz (EFV) seul et en présence des différentes compositions F2 et F3 selon le tableau 4. **B:** montre la variation de la conductance du tissu en présence de la composition F2. La perméabilité apparente de l'EFV est augmentée en présence de F2 et F3. \*\*  $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ .

Figure 4: **A:** Perméabilité apparente de l'Atazanavir (ATV) seul et en présence des différentes compositions F2 et F3 selon le tableau 4. **B:** montre la variation de la conductance du tissu en présence de la composition F2. La perméabilité apparente de l'ATV est augmentée en présence de F2 et F3. \*\*  $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ .

Figure 5: **A:** Perméabilité apparente de la FD4 et en présence de la composition F2 selon le tableau 4. **B:** montre la variation de la conductance du tissu qui augmente en présence de la composition F2. \*\*\*  $p < 0.0002$ .

Figure 6: **A:** Perméabilité apparente des anticancéreux Cisplatine (Cisp) et l'Oxaliplatine (Oxa) en présence de la composition F2. **B:** montre la variation de la conductance du tissu qui augmente en présence de la composition F2. \*\*\*  $p < 0.0002$ .

### Selon l'invention, la composition peut être utilisée:

- en tant qu'adjuvant de médicament pour la facilitation et l'augmentation du transport des médicaments au travers des barrières biologiques,
- en tant qu'excipient pour favoriser le passage des médicaments au travers des barrières biologiques,
- pour augmenter la biodisponibilité par voie orale des vitamines, des nutriments, des oligoéléments et les sels minéraux.
- pour augmenter le passage de traceurs biologiques au travers des barrières biologiques pour faire le diagnostic médical et l'exploration fonctionnelle,



## REVENDECATIONS

1. Composition comprenant un extrait d'Hibiscus Sabdariffa, pour son utilisation pour augmenter le passage des xénobiotiques, des médicaments et des nutriments au travers des barrières biologiques.
2. Composition comprenant un extrait d'Hibiscus Sabdariffa pour son utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que cet extrait d'hibiscus sabdariffa soit associé à au moins un acide organique naturel, parmi les suivants: acide acétique, acide aspartique, acide butyrique, acide citrique, acide formique, acide glycolique, acide malique, acide oxalique, acide propionique, acide tartarique, acide ascorbique, acide galacturonique, acide utalonique, acide gallique, acide protocatéchique.
3. Composition comprenant un extrait d'Hibiscus Sabdariffa pour son utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que cet extrait d'hibiscus sabdariffa soit associé à au moins un acide organique naturel natif de Vaccinium myrtillus parmi les acides suivantes: acide 4-hydroxycinnamique, acide acétique-hex-trans-2-enyl-ester, acide P-hydroxy-benzoïque, acide Butyrique-hex-trans-2-enyl-ester, acide P-hydroxy-benzoïque.
4. Composition comprenant un extrait d'Hibiscus Sabdariffa selon les revendications 1 à 3 caractérisée en ce qu'elle soit associée à au moins du bicarbonate de préférence du bicarbonate de sodium.
5. Composition selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, en tant que médicament.
6. Composition selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, en tant qu'adjuvant de médicament.
7. Composition selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, en tant qu'excipient.
8. Composition selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, en tant que promoteur ou facilitateur de l'absorption intestinale des médicaments, des nutriments et des Oligoéléments.
9. Composition selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, en tant que traceurs biologiques pour faire le diagnostic médical et l'exploration fonctionnelle.
10. Composition comprenant un extrait d'Hibiscus Sabdariffa selon des revendications 1 à 10, pour son utilisation pour augmenter le passage des xénobiotiques, des médicaments, des nutriments, au travers des barrières biologiques au cours d'études expérimentales, fondamentales et appliquées.

## **Abrégé**

Composition à base d'extrait d'hibiscus sabdariffa, pour son utilisation pour augmenter le passage des xénobiotiques, des médicaments et des nutriments au travers des barrières biologiques. Selon l'invention, cette composition doit comprendre au moins un extrait d'un des acides organiques naturels contenu dans cette plantes ou dans la plante *Vaccinium myrtillus*.

Figures

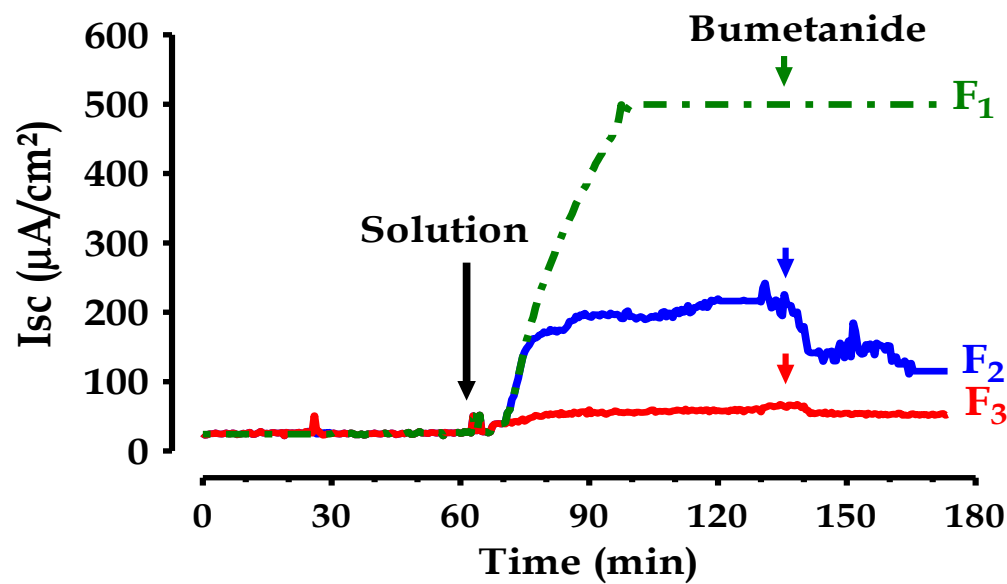


Figure 1

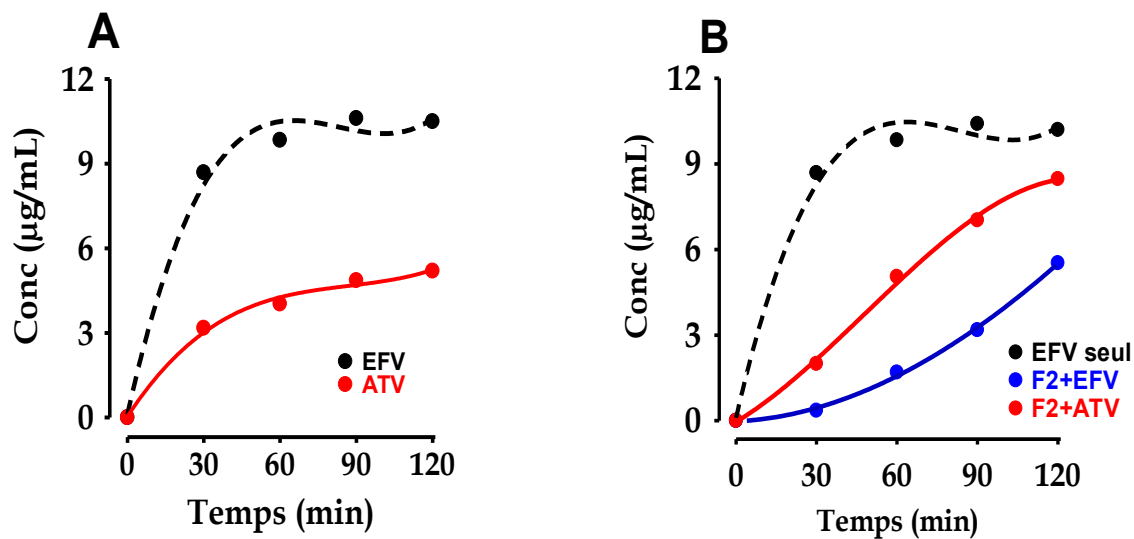


Figure 2

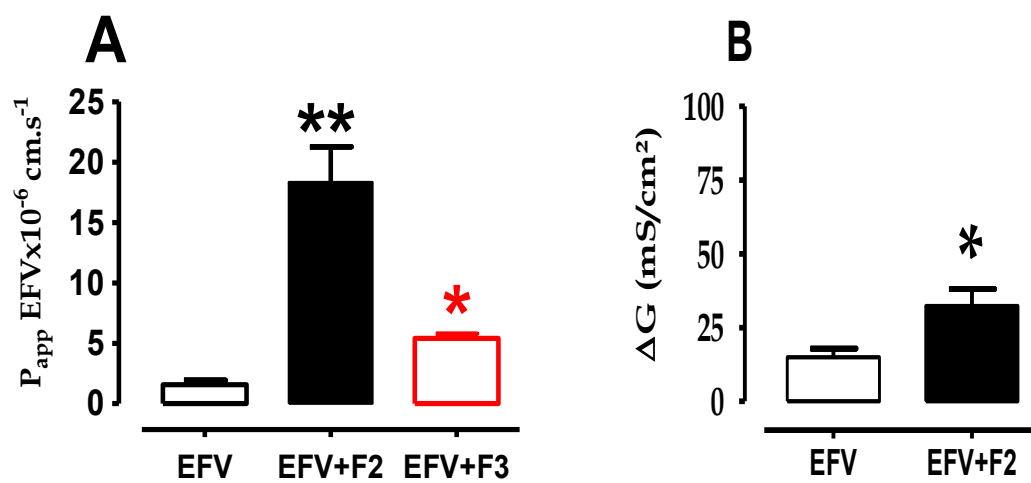


Figure 3

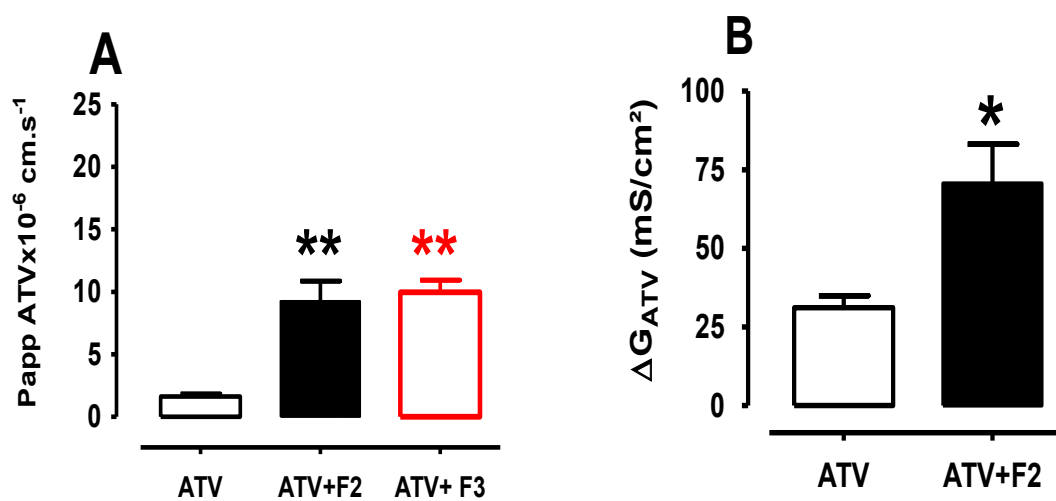


Figure 4

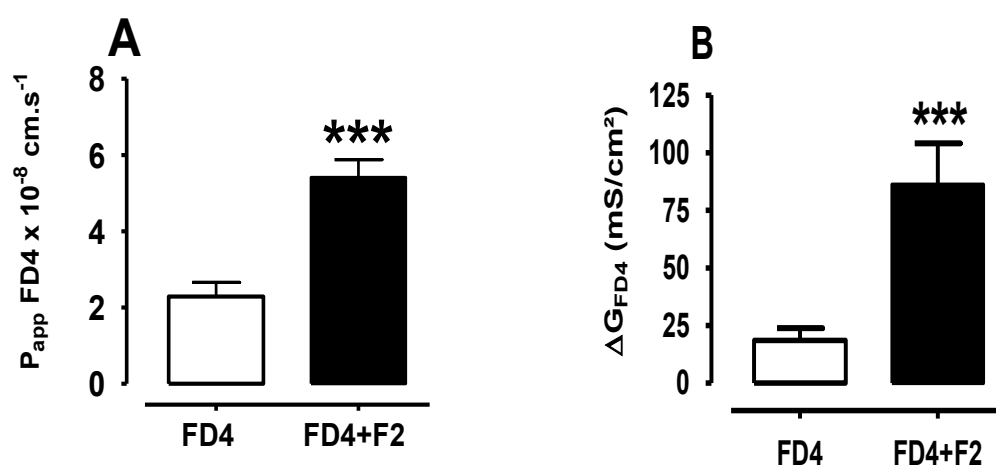


Figure 5

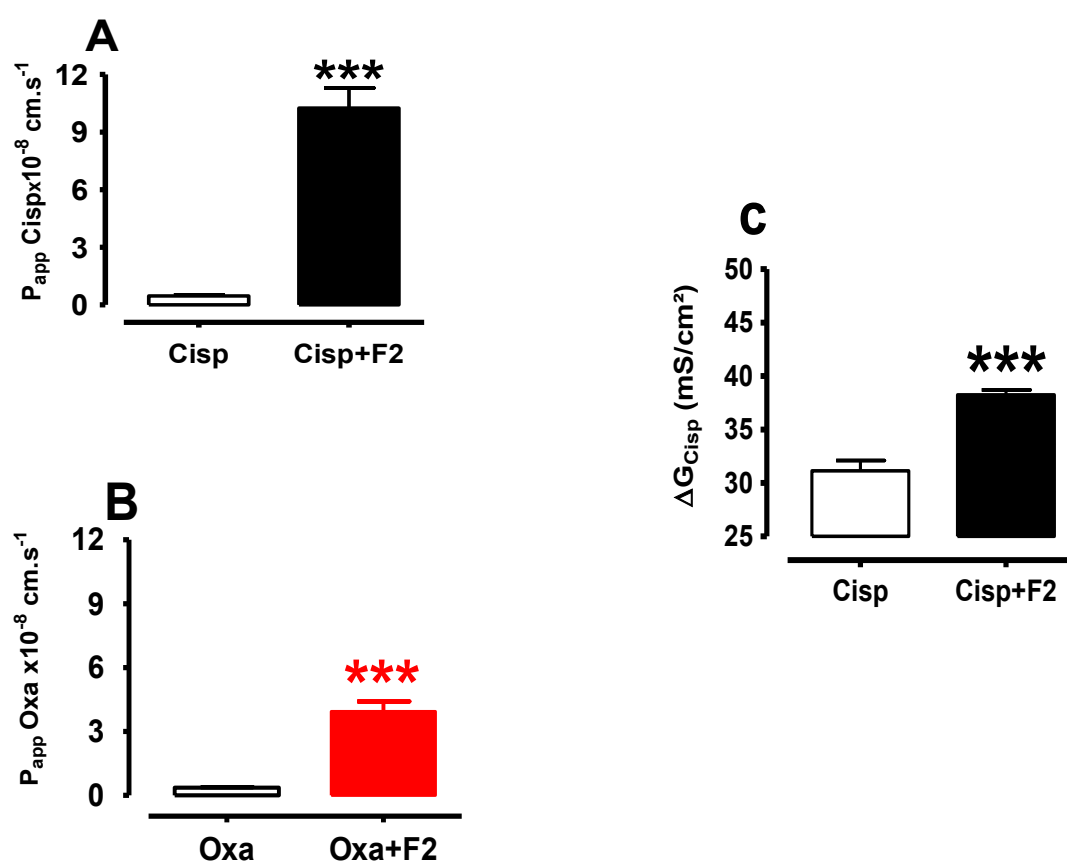


Figure 6

# Publication N° 1

**Title:** Metronidazole effects on microbiota and mucus layer thickness in the rat gut

Marie-Agnès Pélissier, Nadia Vasquez, Ramadass Balamurugan, Ester Pereira, **Flore Dossou-Yovo**, Antonia Suau, Philippe Pochart & Fabien Magne.

**FEMS Microbiol Ecol 73 (2010) 601–610**

## Résumé

Le but de cette étude était d'évaluer, l'impact de la modification de la population microbienne sur l'épaisseur de la couche de mucus, après un traitement au Métronidazole.

Les analyses faites par les techniques de réaction en chaîne par polymérase, (PCR en temps réel dit PCR quantitative), et de PCR par électrophorèse sur gel à gradient de température (PCR-TTGE), ont montré que cette modification de l'écologie microbienne après traitement au Métronidazole se fait en faveur de bifidobactéries et d'entérobactéries qui augmentent en nombre. L'espèce dominante de bactéries bifides est le *Bifidobacterium pseudo longum*. L'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), associée à la qPCR a permis donc de localiser et d'évaluer, l'augmentation des bifidobactéries associées à la muqueuse intestinale, puis de mesurer l'épaisseur de la couche de mucus du colon qui a doublé de valeur dans le groupe des rats traités.

Ces résultats pourraient expliquer les avantages de traitement au métronidazole et justifier les investigations supplémentaires pour définir le rôle de ces bifidobactéries dans la muqueuse du colon.

## RESEARCH ARTICLE

# Metronidazole effects on microbiota and mucus layer thickness in the rat gut

Marie-Agnès Pélissier<sup>1</sup>, Nadia Vasquez<sup>1</sup>, Ramadass Balamurugan<sup>2</sup>, Ester Pereira<sup>1</sup>, Flore Dossou-Yovo<sup>1</sup>, Antonia Suau<sup>1</sup>, Philippe Pochart<sup>1</sup> & Fabien Magne<sup>1</sup>

<sup>1</sup>EA 3199, Laboratoire de Biologie, CNAM, Paris, France; and <sup>2</sup>Section of Gastroenterology, New Mexico VA Health care System, Department of Medicine, The University of New Mexico, Albuquerque, NM, USA

**Correspondence:** Fabien Magne, EA 3199, Laboratoire de Biologie, CNAM, 2 rue Conté, 75003 Paris, France. Tel.: +33 15 880 8575; fax: +33 14 027 2380; e-mail: fabien.magne@cnam.fr

Received 18 December 2009; revised 1 May 2010; accepted 13 May 2010.  
Final version published online 23 June 2010.

DOI:10.1111/j.1574-6941.2010.00916.x

Editor: Julian Marchesi

## Keywords

metronidazole; bifidobacteria; inflammatory bowel diseases; oxidative stress; microbiota; mucus layer.

## Abstract

Both mucus and mucosa-associated bacteria form a specific environment in the gut; their disruption may play a crucial role in the development of intestinal bowel disease (IBD). Metronidazole, an antibiotic used in the treatment of IBD, alters gut microbiota and reduces basal oxidative stress to proteins in colonic tissue of healthy rats. The aim of this study was to evaluate the impact of the altered microbiota due to the metronidazole on the thickness of the mucus layer. This study was performed in healthy untreated rats (control group) or rats treated by metronidazole (metronidazole-treated rats, 1 mg mL<sup>-1</sup> in drinking water for 7 days). Both PCR-temporal temperature gradient gel electrophoresis and quantitative PCR (qPCR) revealed an altered microbiota with an increase in bifidobacteria and enterobacteria in metronidazole-treated rats compared with control rats. Moreover, a dominant bifidobacterial species, *Bifidobacterium pseudolongum*, was detected. Using qPCR and FISH, we showed that bifidobacteria were also increased in the microbiota-associated mucosa. At the same time, the mucus layer thickness was increased approximately twofold. These results could explain the benefits of metronidazole treatment and warrant further investigations to define the role of bifidobacteria in the colonic mucosa.

## Introduction

A chief constituent of the gastrointestinal tract is the protective mucus layer that is produced by goblet cells. The mucus layer is essential as a lubricant and protective dynamic barrier, playing an important role in the penetration of the mucosa by luminal bacteria and their products. In inflammatory intestinal bowel diseases (IBD), mucus has also been considered as the first line of defence against oxidative stress induced by potentially damaging agents such as reactive oxygen species (Cross *et al.*, 1984; Grisham *et al.*, 1990; Corfield *et al.*, 2000). The thickness and composition of the mucus layer were altered in patients with IBD (Pullan *et al.*, 1994; Einerhand *et al.*, 2002; Strugala *et al.*, 2008; Gersemann *et al.*, 2009), which can diminish protection against the endogenous microbiota compared with healthy subjects (Schultz *et al.*, 1999).

Many studies have pointed toward a pathogenic role of commensal gut microbiota in IBD. Metagenomic studies have shown that entire classes of faecal bacteria are lost or

overrepresented as part of the IBD process (Frank *et al.*, 2007; Peterson *et al.*, 2008). Furthermore, other studies using animal models of IBD have also shown the role of the intestinal microbiota in this disease (Janeczko *et al.*, 2008; Xenoulis *et al.*, 2008; Suchodolski *et al.*, 2010). An alteration in the mucosa-associated microbiota, for example a predominance of some potentially harmful bacterial groups or a decrease in potentially beneficial bacterial species, was observed in patients with IBD (Swidsinski *et al.*, 2002; Seksik *et al.*, 2003; Lepage *et al.*, 2005; Conte *et al.*, 2006; Frank *et al.*, 2007; Sepehri *et al.*, 2007; Sokol *et al.*, 2008; Fyderrek *et al.*, 2009; Willing *et al.*, 2009).

Antibiotic treatment alleviates intestinal inflammation in humans and experimental animals (Madsen *et al.*, 2000; Rath *et al.*, 2001), which shows the role of the intestinal microbiota in the induction and maintenance of intestinal lesions (Garcia-Lafuente *et al.*, 1997; Sartor, 2000; Podolsky, 2002; Sartor, 2008).

Metronidazole, a nitroimidazole antibiotic effective against anaerobes, is routinely used and a recent

meta-analysis revealed its benefit in long-term therapy for Crohn's disease (CD) (Feller *et al.*, 2010). Otherwise, it has been used to treat pouchitis (Sartor, 2004) and has been shown to decrease postoperative recurrence in CD patients (Rutgeerts *et al.*, 1995). A randomized, placebo-controlled study used a 3-month course of metronidazole in combination with 1 year of azathioprine, and led to a reduction in 1-year endoscopic recurrences in 81 operated patients with a high risk of recurrence (D'Haens *et al.*, 2008). We have demonstrated previously that oral administration of metronidazole reduced basal oxidative stress in colonic tissue of healthy rat (Pélissier *et al.*, 2007). Moreover, in a recent study, we suggested that this antioxidant effect could be linked to the modified composition of colonic microbiota and particularly to the increased bifidobacterial populations induced by metronidazole (Vasquez *et al.*, 2009). Considering the protective role of the mucus layer against oxidative stress, we hypothesized that metronidazole could also be involved in the modulation of the mucus layer through the alteration of intestinal microbiota.

The aim of this study was therefore to investigate whether an alteration in microbiota due to metronidazole treatment can modulate the mucus layer. Luminal and mucosa-associated microbiota, in the small intestine and in the colon, were characterized using PCR-temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE), quantitative PCR (qPCR) and FISH. The mucus layer thickness was measured in the colonic mucosa.

## Materials and methods

### Animals and treatment

Thirty-two male Wistar rats (Charles River, France) weighing between 200 and 250 g were accommodated in a room with controlled temperature, humidity and light (12 h light/dark cycle) and maintained for 1 week on standard rodent chow (UAR, France) *ad libitum*. Metronidazole treatment was administered in drinking water ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) during 1 week. The drinking volume was similar in the groups during the course of the experiment. At the end of the treatment, rats were weighed and anaesthetized by administration of 5% sodium pentobarbital and samples were collected.

Rats were cared for in compliance with the French Ministry of Agriculture regulations and were randomly assigned to control and metronidazole groups (16 rats in each group). The work in rats complied with the relevant European Community directive (86/609/EEC) and was conducted under the supervision of an accredited expert (F.D.-Y.).

### Samples

Caecal and faecal contents were collected in sterile tubes, weighed and immediately frozen at  $-80^\circ\text{C}$  for microbiota analysis.

Tissues from the colon were removed immediately and placed on ice. To maintain luminal contents and to preserve integrity of the mucus layer, portions (1.5 cm) were ligated at their extremities as a closed tube. Each sample was fixed in cold Carnoy's solution (ethanol 6:acetic acid 3:chloroform 1 v/v/v) and incubated at  $4^\circ\text{C}$  overnight, then processed and embedded into paraffin blocks. Paraffin sections of  $5 \mu\text{m}$  were placed on organosilane-coated slides and stored at room temperature for histological observations and for the analysis of the microbiota associated with mucosa.

### Extraction and purification of total DNA from faecal samples and caecal contents

Total DNA was extracted from 125 mg of frozen caecal contents or faecal samples using a bead-beating method, as described previously (Magne *et al.*, 2006). Briefly, bacterial cells were lysed mechanically for 10 min using glass beads, 0.1 mm in diameter (Biospec Products Inc., Bartlesville, OK). DNA was purified using the phenol-chloroform treatment and precipitated using isopropanol. Dry pellets were suspended in 50 or 100  $\mu\text{L}$  of sterile water and stored at  $-20^\circ\text{C}$ . The amount and integrity of DNA were estimated using 2% w/v agarose gel electrophoresis containing ethidium bromide ( $0.1 \text{ ng mL}^{-1}$ ) in  $1 \times$  Tris-borate-EDTA.

### PCR-TTGE bacteria

The primers Bia339 and Bia788 were used to amplify the variable regions 3 and 4 of the bacterial 16S rRNA genes. A GC-rich sequence (Table 1) was added to the 5' end of the primer Bia788. The protocol has been described previously (Magne *et al.*, 2006). The Dcode universal mutation detection system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) was used for the sequence-specific separation of amplicons. Additionally, known bacterial strains were used to standardize band migration and gel curvature among different gels. This marker consisted of the following organisms listed in their migration order: *Bacteroides* sp., *Prevotella* sp., *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* and *Bifidobacterium longum* (*B. longum* ssp. *longum*). DNA fragments were visualized using SYBR Green I staining (Interchim, Montluçon, France). Gel was scanned using Gel Doc 2000 (Bio-Rad Laboratories). The gel patterns were analysed using DIVERSITY DATABASE 2.1 software, which is part of the Discovery Series (Bio-Rad Laboratories).

### PCR-TTGE bifidobacteria

The forward primer Bif164 and the reverse primer Bif662 (Satokari *et al.*, 2001) were used to amplify 16S rRNA genes of the bifidobacteria from the samples. Bifidobacterial PCR-TTGE was realized as summarized for the bacterial PCR-TTGE (Mangin *et al.*, 2006). The ladder consisted of



**Table 1.** Oligonucleotide probes used in the study

	Target	Sequence from 5' to 3' end	OPD code*	References
NON EUB 338	FISH	ACA TCC TAC GGG AGG C	S-D-Bact-0338-a-S-18	Wallner <i>et al.</i> (1993)
EUB 338	FISH	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	S-D-Bact-0338-a-A-18	Amann <i>et al.</i> (1990)
Bif 164	FISH	CAT CCG GCA TTA CCA CCC	S-G-Bif-0164-b-A-18	Langendijk <i>et al.</i> (1995)
Enter 1458	FISH	CAT GAA TCA CAA AGT GGT AAG CGC C	S-G-Enter-1458-a-A-25	Mittelman <i>et al.</i> (1997)
Erec 482	FISH	GCT TCT TAG TCA GGT ACC G	S-Erec-0482-a-A-19	Franks <i>et al.</i> (1998)
Bia 339	PCR	CTC CTA CGG GAG GCA GCA GT	S-D-Bact-339-a-S-20	Amann <i>et al.</i> (1990)
Bia 788	PCR	GGA CTA CCA GGG TAT CTA A	S-D-Bact-788-a-A-19	Magne <i>et al.</i> (2006)
Bif 164	PCR	GGG TGG TAA TGC CGG ATG	S-G-Bif-0164-b-S-18	Langendijk <i>et al.</i> (1995)
Bif 662	PCR	CCA CCG TTA CAC CGG GAA	S-G-Bif-0662-b-A-18	Langendijk <i>et al.</i> (1995)
Ent 1113	PCR	TGG CAA CAA AGG ATA AGG	S-Enter-1113-a-S-15	In this study
Ent 1418	PCR	CTT TTG CAA CCC ACT	S-Enter-1418-a-A-15	Sghir <i>et al.</i> (2000)
GC clamp	PCR	CCC CCC CCC CGC CCC CCG CCC CCC GCC CCC GCC GCC C		

\*Position in the 16S rRNA gene of *Escherichia coli*.

bifidobacterial strains isolated in human faecal microbiota: *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium breve*, *B. longum* (*B. longum* ssp. *longum*), *Bifidobacterium gallicum*, *Bifidobacterium dentium*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium animalis* (*B. animalis* ssp. *animalis*) and *Bifidobacterium lactis* (*Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*).

### Identification of bands from PCR-TTGE profiles

For identification, bands were excised from TTGE gels, cloned and sequenced. This protocol has been described previously (Magne *et al.*, 2006). Newly determined sequences were compared with those available in public databases (Ribosomal Database Project and GenBank®) in order to ascertain their closest relatives. A molecular species comprised all sequences with at least 98% sequence similarity (reference strains, isolates, clones) (Suau *et al.*, 1999).

### Quantification of caecal and faecal bacterial groups using qPCR

qPCR was used to quantify total bacteria as well as bifidobacteria and the enterobacteria in faecal and caecal contents. The primer sequences are presented in Table 1. The forward primer Bia339 and the reverse primer Bia788 were used to amplify variable regions 3 and 4 of the bacterial 16S rRNA genes (Vasquez *et al.*, 2009). The forward primer Bif164 and the reverse primer Bif662 were used to amplify 16S rRNA genes of bifidobacteria. To amplify 16S rRNA genes of enterobacteria, the forward primer Ent1113 and the reverse primer Ent1418 were used.

qPCR was performed using a Mastercycler ep realplex (Eppendorf SARL, Le Pecq, France). Amplification conditions have been described previously (Vasquez *et al.*, 2009). The specific annealing temperatures were 55 °C for total

bacteria, 62 °C for bifidobacteria and 58 °C for enterobacteria. To determine the specificity of amplification, the melting curve was determined after the last cycle of amplification (96 °C for 30 s, slow heating from 60 to 96 °C for 20 min and 96 °C for 30 s). Analysis of this curve provided the melting temperatures of the PCR products. Melting curve profiles are different for specific and nonspecific amplicons based on the GC content, amplicon length and secondary structure. Negative and positive controls were included on each plate. Standard curves were constructed using a cloned 16S rRNA gene in pGEM-T (Promega Corp., Madison, WI). The plasmid concentration was determined spectrophotometrically using  $A_{260\text{ nm}}$  ( $A_1$ ) and  $A_{280\text{ nm}}$  ( $A_2$ ), with the following formula: DNA concentration =  $62.9 \times A_1 - 36 \times A_2$  (Shimadzu Corp.). The plasmid copy number was obtained by dividing the DNA concentration by the plasmid mass, with the plasmid mass being equal to  $3.82 \times 10^{18}$  g. Serial dilutions were performed, and  $10^2$ – $10^9$  copies were used for calibration. A standard curve was constructed by plotting the threshold cycles of these dilutions. The quantity of target gene in a sample was determined using the standard curve.

### FISH

The FISH protocol had been described previously (Vasquez *et al.*, 2007). Briefly, sections were deparaffinized, rehydrated and postfixed in 4% paraformaldehyde. Tissue sections were washed and then hybridized with a hybridization solution containing  $4.5\text{ ng }\mu\text{L}^{-1}$  of one of the 5'-end-Cy3-labelled 16S rRNA gene-targeted oligonucleotide probes (Table 1). The entire mucosal surface and epithelium of each section was observed to identify and to localize the bacteria (within the mucus layer, attached to the epithelial surface, inside epithelial cells or in crypts).

The proportion of bacteria hybridized with the group-specific probe was expressed as a percent of total bacteria. Ten fields were examined for each sample and a mean percentage was calculated. The proportion of colonized crypts was expressed as a percent of the total crypts.

### Thickness of the mucus layer

Mucus thickness was measured on two successive sections of proximal colon near the caecum. Regarding the localization of microbiota, the increased viscosity in the distal colon stopped the penetration of the mucus by bacterial groups (Swidsinski *et al.*, 2007). Hence, the distal colon where solid faeces are formed was not suitable for the present experiment.

The sections were deparaffinized in xylene and rehydrated for 3 min in 100%, 96% and 70% ethanol successively. One of the two sections was stained with Alcian blue/periodic acid Schiff (AB/PAS) specific for mucins (1% AB 8GX in 3% acetic acid, pH 2.5) for 10 min. After a wash in 3% acetic acid and deionized water, the sections were oxidized in 0.5% periodic acid for 5 min, then washed with deionized water and mounted with Eukitt to measure the adherent mucus layer thickness (Péliissier *et al.*, 2006). The second section was hybridized with EUB 338, as described above. Two independent investigators measured four randomly selected places in microscopic fields, for each rat.

Using photomicrographs of successive sections, both the mucus thickness (using AB/PAS staining, specific of mucins) and the distance between the epithelial surface [using 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining] and bacteria (using both DAPI staining and hybridization with Eub 338 probe) were measured. An epifluorescence microscope Leica DMRB using Cy3 and DAPI-specific filters at  $\times 100$ ,  $\times 400$  and  $\times 1000$  magnifications was used. Images were captured using a Leica DFC 300 FX camera and FW 4000 software (Leica microsystems SAS, Rueil-Malmaison, France). These images were made consecutively in real colours and were not manipulated, except for brightness and contrast.

### Preparation of tissue homogenates for oxidative stress parameters' measurements

The colon and the small intestine were gently rinsed with 0.9% NaCl and opened, the mucosa was scraped away with the blunt edge of a glass slide washed in 10 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 150 mmol L<sup>-1</sup> KCl, 1 mmol L<sup>-1</sup> EDTA buffer (pH 7.4) and centrifuged for 5 min at 700 g. The colonic and small intestine pellets were homogenized (1:9 w/v and 1:3 w/v, respectively) using a Teflon pestle/glass homogenizer in the same buffer supplemented with 0.25 mmol L<sup>-1</sup> phenyl-methylsulphonyl fluoride. All homogenates were frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further use.

Lipid peroxidation [thiobarbituric acid-reactive substances (Tbars)] was measured by a modification (Albrecht *et al.*, 1992) of the method described by Ohkawa *et al.* (1979). The carbonyl contents in oxidized proteins (PCO) were assessed using the method described by Levine *et al.* (1990), and the concentration of carbonyl groups was calculated using 21.5 nmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> as the extinction coefficient for aliphatic hydrazones. The levels of nonprotein sulphhydryl groups, mostly glutathione, were measured as described previously (Sedlak & Lindsay, 1968). The results were expressed in relation to the protein concentration using Lowry's method (Lowry *et al.*, 1951).

### Statistical analysis

Data were analysed using STATGRAPHICS PLUS software package version 5.1 (Rockville, MD). ANOVA was performed using the general linear model procedure. Results were expressed as mean values  $\pm$  SEM. For the microbial analysis, bacterial counts of the caecal contents and faecal samples were expressed as mean log 16S rRNA gene copies g<sup>-1</sup> (wet weight)  $\pm$  SEM. The quantification of mucosa-associated bacteria using FISH was expressed as the mean of the percentage of hybridized cell mm<sup>-2</sup>  $\pm$  SEM.

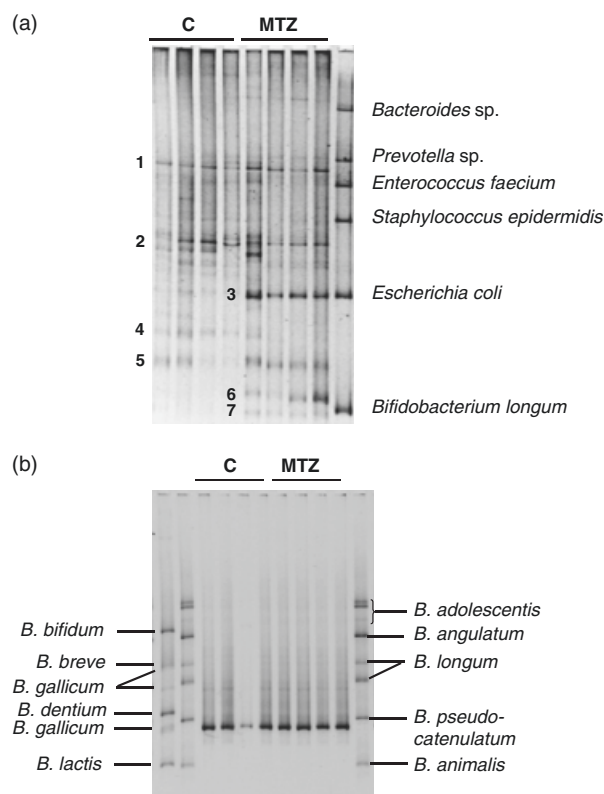
## Results

### Bacterial diversity of caecal content using PCR-TTGE

An example of a bacterial PCR-TTGE gel (cecal samples of eight rats, four per group) is presented in Fig. 1a. Seven major bands were retrieved in at least two profiles and represented the dominant microbiota. Bands 1, 2 and 5 were conserved within all profiles (control and metronidazole-treated rats). Band 4 was faint, but was present in the microbiota of control rats and not in the profiles of those under metronidazole treatment. Conversely, three bands were retrieved only in the band profiles of the metronidazole group or were stronger: bands 3, 6 and 7. Bands 3 and 7 comigrated, respectively, with *E. coli* and *B. longum* (included in the marker line). Moreover, the migration of bands 6 and 7 corresponded to the migration of bifidobacterial strains (Magne *et al.*, 2006).

### Bifidobacterial diversity of caecal content using PCR-TTGE

Because bacterial PCR-TTGE had shown differences for bands in the bottom of the gel (DNA of high G+C bacteria are more resistant to denaturation), bifidobacterial species were analysed using bifidobacterial PCR-TTGE in caecal samples (Fig. 1b). Surprisingly, only one band was observed and conserved in all samples. It had been excised to be sequenced. It belonged to the species *Bifidobacterium pseudolongum*.



**Fig. 1.** (a) PCR/temperature gradient gel electrophoresis patterns of bacteria from the caecal contents of eight rats: control (C) and metronidazole (MTZ) groups. (b) PCR/temperature gradient gel electrophoresis patterns of bifidobacteria from the caecal contents of eight rats: control (C) and MTZ groups.

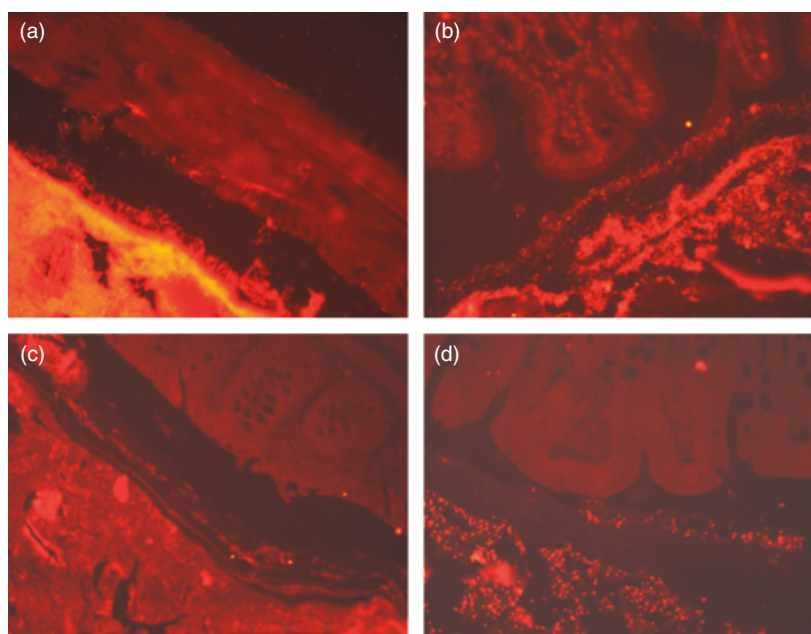
### Bacterial quantification in caecal and faecal samples using qPCR

Regarding the results of bacterial and bifidobacterial PCR-TTGE, qPCR was used to quantify groups in faecal and caecal contents (log 16S rRNA gene copies  $g^{-1}$ ). Bacteria counts, assessed using qPCR, remained stable in the caecal content ( $10.7 \pm 0.04$  in the control group vs.  $10.6 \pm 0.05$  in the metronidazole group) and in the faecal content ( $10.7 \pm 0.06$  in the control group vs.  $10.8 \pm 0.07$  in the metronidazole group).

Enterobacteria and bifidobacteria were detected in all caecal and faecal samples and were significantly increased in rats under metronidazole treatment. The concentrations of enterobacteria were increased 30-fold in the caecal content between the control and the metronidazole groups,  $7.3 \pm 0.14$  vs.  $8.8 \pm 0.20$  ( $P < 0.05$ ), and increased 300-fold in the faecal content  $6.4 \pm 0.14$  vs.  $8.9 \pm 0.24$  ( $P < 0.05$ ). Bifidobacterial populations were increased 100-fold between the control and the metronidazole-treated rats:  $7.4 \pm 0.27$  vs.  $9.4 \pm 0.19$  ( $P < 0.05$ ) in the caecal content and  $8.0 \pm 0.22$  vs.  $9.6 \pm 0.11$  ( $P < 0.05$ ) in the faecal content.

### Bacterial distribution of the mucosa using FISH

In the control group, bifidobacteria were not detected in the mucosa-associated microbiota, whereas this bacterial group was identified in all rats of the metronidazole group, reaching about  $3 \pm 0.6\%$  of the total bacteria in the proximal colon and  $4 \pm 1.0\%$  in the distal colon (Fig. 2).



**Fig. 2.** Detection of total bacteria and bifidobacteria in the proximal colon of control and metronidazole-treated rats. (a, b) FISH with the Eub338-Cy3 probe, original magnification ( $\times 400$ ). (c, d) FISH with the Bif164-Cy3 probe, original magnification ( $\times 400$ ). (a, c) control rats and (b, d) metronidazole-treated rats.

In the control group, few crypts were colonized either in the proximal ( $6 \pm 1.1\%$ ) or in the distal colon ( $3 \pm 1.3\%$ ). In the metronidazole group, more crypts were colonized in the proximal colon ( $35 \pm 3.2\%$ ), whereas in the distal colon, few colonized crypts could be observed ( $1 \pm 0.6\%$ ) as for control

**Table 2.** Effect of metronidazole on the total thickness and width bacteria epithelium of the mucus layer

Parameters ( $\mu\text{m}$ )	Control group	MTZ group
Total mucus thickness	$25.8 \pm 0.69^a$	$47.6 \pm 1.95^b$
Width bacteria epithelium	$19.7 \pm 1.0^a$	$40.1 \pm 1.78^b$

Values are presented as means  $\pm$  SEM.

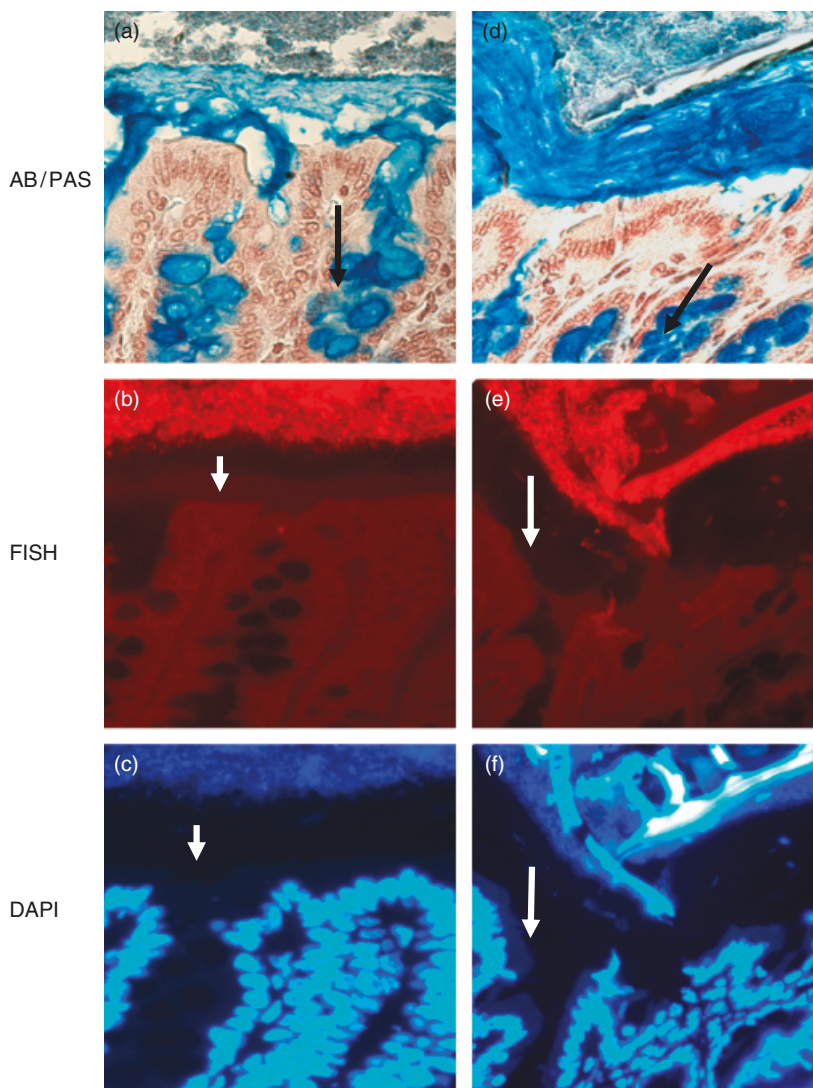
Within the lines, the values for a parameter, not sharing the same superscript, are significantly different from those of the control group ( $P < 0.05$ ).

Within the columns, values for a group, sharing \*denote values significantly different between the parameters ( $P < 0.05$ ).

group. In order to determine which bacteria colonized the crypts, other probes were tested. The *Clostridium coccoides* group was the most important bacterial group retrieved:  $84 \pm 1.9\%$  and  $79 \pm 3.8\%$  of the total bacteria in the control and the metronidazole groups, respectively. In contrast, the bifidobacteria and the *Gammaproteobacteria* were not detected in crypts.

### Evaluation of the mucus thickness and FISH

Using the AB/PAS staining method, the thickness of adherent mucus in the proximal colon was significantly increased after metronidazole administration ( $47.6 \mu\text{m} \pm 1.95$  vs.  $25.8 \mu\text{m} \pm 0.69$ ,  $P < 0.05$ ; +84%) as shown in Table 2 and in Fig. 3 (a and d). Occasionally, a separation could be observed between the mucus layer and the epithelial surface, and may be attributed to partial mucus shrinkage during the



**Fig. 3.** Thickness of the total mucus layer and width between bacteria and colonic mucosa in proximal segments of control and metronidazole (MTZ)-treated rats. Successive sections from control (a, b, c) and MTZ-treated (d, e, f) rats (original magnification,  $\times 400$ ). AB/PAS staining (a and d): the total mucus surface was measured as a continuous layer between the mucosal surface and bacteria located within the luminal content. Increased mucus layer was observed in MTZ-treated rats (d). Goblet cells are filled with mucus (black arrows) either in the control or in the MTZ-treated group. FISH simultaneous photomicrographs of orange fluorescence of the universal bacterial Eub338 Cy3 probe (b and e) and DAPI fluorescence (c and f), with the blue colour representing mainly nuclei. Bacteria are separated from the epithelial surface of the colon by the mucus layer, allowing the measure of the width between bacteria and mucosa (white arrows), which also augmented with MTZ treatment (e, f).

**Table 3.** Effect of metronidazole on oxidative stress and antioxidant defence in the colon and small intestine of rats

Parameters (nmol mg protein <sup>-1</sup> )	Control group	MTZ group
Protein carbonyls		
Small intestine	5.3 ± 0.42 <sup>a</sup>	5.2 ± 0.44 <sup>a</sup>
Colon	3.2 ± 0.32 <sup>a</sup>	2.4 ± 0.14 <sup>b</sup>
Thiobarbituric acid-reactive substances		
Small intestine	0.7 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.02 <sup>a</sup>
Colon	0.6 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.03 <sup>a</sup>
Glutathione		
Small intestine	14.1 ± 0.81 <sup>a</sup>	15.2 ± 1.96 <sup>a</sup>
Colon	7.1 ± 0.56 <sup>a</sup>	6.0 ± 0.79 <sup>a</sup>

Values are presented as means ± SEM ( $n = 16$ ).

Within the lines, values for a parameter measured in a target organ, not sharing the same superscript, are significantly different ( $P < 0.05$ ).

histological procedure (Ota & Katsuyama, 1992). Using FISH, the mucus layer can be perceived as a continuous space between mucosal surface and luminal microbiota: bacteria are separated from the epithelial surface along the colon as shown in Fig. 3 (b and c for the control and e and f for the metronidazole group). Distances between bacteria and epithelial mucosa were also augmented in the metronidazole group ( $40.1 \mu\text{m} \pm 1.78$  vs.  $19.7 \mu\text{m} \pm 1.0$ ,  $P < 0.05$ ; +103%) as shown in Table 2 and in Fig. 3 (e and f). The distance between the bacteria and the epithelial surface (FISH method) was less important than the total mucus thickness (AB/PAS staining method). The discrepancy between the measures showed that a fraction of the microbiota was able to penetrate the upper part of the mucus layer.

### Effect of metronidazole treatment on oxidative stress markers and antioxidant defence

Metronidazole treatment did not alter the levels of glutathione along the gut. Metronidazole reduced the protein carbonyl levels only in colonic tissue ( $-19\%$ ,  $P < 0.05$ ). After antibiotic treatment, lipid peroxidation assessed by the Tbars contents was similar to the control levels along the bowel (Table 3).

### Discussion

In the present study, we investigated the impact of the altered microbiota due to the metronidazole on the colonic mucosa through measurement of the adherent mucus layer in healthy rats. First, we have confirmed that the metronidazole treatment, in healthy rat, exerted an antioxidant effect by reducing the colonic protein carbonyl levels (Pelissier *et al.*, 2007). Second, the altered microbiota due to the metronidazole treatment revealed an increase in the bifidobacterial population ( $2 \log_{10}$  higher than the control level) as described previously (Vasquez *et al.*, 2007). The analysis of the intestinal microbiota of metronidazole-treated rats using

PCR-TTGE revealed a dominant bifidobacterial species, *B. pseudolongum* (band sequencing). Moreover, the quantifications of bifidobacteria in the control groups were in agreement ( $\log 16\text{S rRNA gene copies g}^{-1}$ , 7.4 for the caecal content and 8 for the faecal content) with previous studies using real-time PCR (average  $7.6 \log$  of cells  $\text{g}^{-1}$  of faeces) (Delroisse *et al.*, 2008) and a culture-based method ( $6.5 \log \text{CFU g}^{-1}$  of raw material) (da S Queiroz-Monici *et al.*, 2005).

No study has focused on the alteration of microbiota due to metronidazole, but many studies have reported the general effects of oral antibiotic treatment on intestinal bacteria, including significant changes in lactobacilli, enterococci/group D streptococci, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* or segmented filamentous bacteria, depending on the antibiotic and treatment protocol (Stecher & Hardt, 2008; Crowell *et al.*, 2009; Garner *et al.*, 2009). In a study, the authors observed that the inclusion of avilamycin in the chicken diet for 14 days resulted in relative increases in the proportions of *Bifidobacterium* sp. in the chicken proximal small intestine (Smirnov *et al.*, 2005). Similar to this study of Smirnov and colleagues, we showed that the bifidobacterial population was also increased in the mucosa-associated microbiota of metronidazole-treated rats. Because of its localization, the mucosa-associated microbiota could be more involved in interactions with the host cells.

The resistance of bifidobacteria to metronidazole has been highlighted previously (Moubareck *et al.*, 2005). Some strains of bifidobacteria lack the ferredoxin system responsible for the reduction of the nitro group in metronidazole, resulting in high percentages of resistance to metronidazole. Furthermore, the quantity that reaches the colon might be low compared with the initial dose because antibiotics are mainly absorbed in the ileum. Hence, bifidobacteria might survive better *in vivo* than *in vitro* (Moubareck *et al.*, 2005), which may explain the increase of bifidobacteria in our study.

The integrity of the mucus layer was observed along the epithelial surface using histological procedures. As described previously, normal murine intestinal microbiota is organized in structurally and distinctively composed compartments, which are specific of each colonic segment (Swidsinski *et al.*, 2005). A continuous mucus layer represents a physical barrier between the underlying epithelium and the potential damaging agents present in the lumen (Sherman *et al.*, 1987). Occasionally, a separation could be observed between the mucus layer and the epithelial surface, and may be attributed to partial mucus shrinkage during the histological procedure (Ota & Katsuyama, 1992). In our study, the proximal colonic mucosa of control rats was covered by a firm layer of mucus gel with a mean thickness of  $26 \mu\text{m}$  ( $13.9\text{--}38.5 \mu\text{m}$ ). This result was in agreement with the other values obtained in colonic tissue of rats whose

values ranged from 20 µm (without fixation) (Rubinstein & Tirosh, 1994) to 47.5 µm in frozen specimens of tissue sectioned with a cryostat and stained with AB/PAS (Strugala *et al.*, 2003) and 53 µm using cryostat sections and celloidin stabilization (Szentkúti & Lorenz, 1995).

This is the first evidence that metronidazole treatment increased the mucus layer thickness (approximately two-fold). In addition, the intestinal mucus layer is reduced in IBD patients; consequently, it could be more predisposed to bacterial degradation (Shirazi *et al.*, 2000). Moreover, a substantial breakdown of the mucus barrier in IBD patients could also result in an increased association of luminal bacteria with this mucus layer (Schultz *et al.*, 1999). In children, noninflamed mucosa of both IBD patients and controls was covered with a thick mucus layer, with the attached microbiota showing a predominance of bifidobacteria (Fyderek *et al.*, 2009). In view of these findings, the high numbers of bifidobacteria in metronidazole-treated rats observed in this study lead us to speculate that these organisms may play a role in the increase of the mucus layer thickness. Hence, this increased protection of the mucosal epithelium can explain the antioxidant effect of the metronidazole. Van der Waaij and colleagues suggested that the interaction between commensal bacteria and the host may take place through an indirect mechanism. Soluble signals from bacteria may diffuse through the mucus layer and these have to escape a shield of IgA, abundant in the mucus (van der Waaij *et al.*, 2005). However, further investigations are needed to define the hypothetical protective role of bifidobacteria on the colonic mucosa.

In conclusion, we confirm that metronidazole treatment in healthy rat (1) exerts an antioxidant effect by reducing the colonic protein carbonyl levels and (2) increases both enterobacterial and bifidobacterial colonic populations. In addition, these changes were associated with an increased thickness of the colonic mucus layer. The links between mucus layer thickness, colonic microbiota and oxidative stress remain to be clarified. Further experiments are needed, on models of IBD, to understand the effect of metronidazole and to determine whether the bifidobacterial community directly impacts on the thickness of mucus layer.

## Acknowledgement

R.B. was a recipient of a postdoctoral fellowship from the Indo-French Science Programme.

## Authors' contribution

M.-A.P. and N.V. contributed equally to this work.

## References

- Albrecht R, Pelissier MA, Atteba S & Smaili M (1992) Dietary restriction decreases thiobarbituric acid-reactive substances generation in the small intestine and in the liver of young rats. *Toxicol Lett* **63**: 91–96.
- Amann RI, Krumholz L & Stahl DA (1990) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J Bacteriol* **172**: 762–770.
- Conte MP, Schippa S, Zamboni I, Penta M, Chiarini F, Seganti L, Osborn J, Falconieri P, Borrelli O & Cucchiara S (2006) Gut-associated bacterial microbiota in paediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gut* **55**: 1760–1767.
- Corfield AP, Myerscough N, Longman R, Sylvester P, Arul S & Pignatelli M (2000) Mucins and mucosal protection in the gastrointestinal tract: new prospects for mucins in the pathology of gastrointestinal disease. *Gut* **47**: 589–594.
- Cross CE, Halliwell B & Allen A (1984) Antioxidant protection: a function of tracheobronchial and gastrointestinal mucus. *Lancet* **1**: 1328–1330.
- Croswell A, Amir E, Tegatz P, Barman M & Salzman NH (2009) Prolonged impact of antibiotics on intestinal microbial ecology and susceptibility to enteric *Salmonella* infection. *Infect Immun* **77**: 2741–2753.
- da S Queiroz-Monici K, Costa GE, da Silva N, Reis SM & de Oliveira AC (2005) Bifidogenic effect of dietary fiber and resistant starch from leguminous on the intestinal microbiota of rats. *Nutrition* **21**: 602–608.
- Delroisse JM, Boulvin AL, Parmentier I, Dauphin RD, Vandenberg M & Portetelle D (2008) Quantification of *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. in rat fecal samples by real-time PCR. *Microbiol Res* **163**: 663–70.
- D'Haens GR, Vermeire S, Van Assche G, Noman M, Aerden I, Van Olmen G & Rutgeerts P (2008) Therapy of metronidazole with azathioprine to prevent postoperative recurrence of Crohn's disease: a controlled randomized trial. *Gastroenterology* **135**: 1123–1129.
- Einerhand AW, Renes IB, Makkink MK, van der SM, Buller HA & Dekker J (2002) Role of mucins in inflammatory bowel disease: important lessons from experimental models. *Eur J Gastroen Hepat* **14**: 757–765.
- Feller M, Huwiler K, Schoepfer A, Shang A, Furrer H & Egger M (2010) Long-term antibiotic treatment for Crohn's disease: systematic review and meta-analysis of placebo-controlled trials. *Clin Infect Dis* **50**: 473–480.
- Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N & Pace NR (2007) Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *P Natl Acad Sci USA* **104**: 13780–13785.
- Franks AH, Harmsen HJ, Raangs GC, Jansen GJ, Schut F & Welling GW (1998) Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent *in situ* hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microb* **64**: 3336–3345.



- Fyderek K, Strus M, Kowalska-Duplaga K *et al.* (2009) Mucosal bacterial microflora and mucus layer thickness in adolescents with inflammatory bowel disease. *World J Gastroentero* **15**: 5287–5294.
- Garcia-Lafuente A, Antolin M, Guarner F *et al.* (1997) Incrimination of anaerobic bacteria in the induction of experimental colitis. *Am J Physiol* **272**: G10–G15.
- Garner CD, Antonopoulos DA, Wagner B, Duhamel GE, Keresztes I, Ross DA, Young VB & Altier C (2009) Perturbation of the small intestine microbial ecology by streptomycin alters pathology in a *Salmonella enterica* serovar typhimurium murine model of infection. *Infect Immun* **77**: 2691–2702.
- Gersemann M, Becker S, Kubler I *et al.* (2009) Differences in goblet cell differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis. *Differentiation* **77**: 84–94.
- Grisham MB, MacDermott RP & Deitch EA (1990) Oxidant defense mechanisms in the human colon. *Inflammation* **14**: 669–680.
- Janecko S, Atwater D, Bogel E *et al.* (2008) The relationship of mucosal bacteria to duodenal histopathology, cytokine mRNA, and clinical disease activity in cats with inflammatory bowel disease. *Vet Microbiol* **128**: 178–193.
- Langendijk PS, Schut F, Jansen GJ, Raangs GC, Kamphuis GR, Wilkinson MH & Welling GW (1995) Quantitative fluorescence *in situ* hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl Environ Microb* **61**: 3069–3075.
- Lepage P, Seksik P, Sutren M, De La Cochetiere MF, Jian R, Marteau P & Dore J (2005) Biodiversity of the mucosa-associated microbiota is stable along the distal digestive tract in healthy individuals and patients with IBD. *Inflamm Bowel Dis* **11**: 473–480.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S & Stadtman ER (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Method Enzymol* **186**: 464–478.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL *et al.* (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265–274.
- Madsen KL, Doyle JS, Tavernini MM, Jewell LD, Rennie RP & Fedorak RN (2000) Antibiotic therapy attenuates colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology* **118**: 1094–1105.
- Magne F, Hachelaf W, Suau A, Boudraa G, Mangin I, Touhami M, Bouziane-Nedjadi K & Pochart P (2006) A longitudinal study of infant faecal microbiota during weaning. *FEMS Microbiol Ecol* **58**: 563–571.
- Mangin I, Suau A, Magne F, Garrido D, Gotteland M, Neut C & Pochart P (2006) Characterization of human intestinal bifidobacteria using competitive PCR and PCR-TTGE. *FEMS Microbiol Ecol* **55**: 28–37.
- Mittelman MW, Habash M, Lacroix JM, Khoury AE & Krajden M (1997) Rapid detection of *Enterobacteriaceae* in urine by fluorescent 16S rRNA *in situ* hybridization on membrane filters. *J Microbiol Meth* **30**: 153–160.
- Moubareck C, Gavini F, Vaugien L, Butel MJ & Doucet-Populaire F (2005) Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. *J Antimicrob Chemoth* **55**: 38–44.
- Ohkawa H, Ohishi N & Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* **95**: 351–358.
- Ota H & Katsuyama T (1992) Alternating laminated array of two types of mucin in the human gastric surface mucous layer. *Histochem J* **24**: 86–92.
- Pelissier MA, Muller C, Hill M & Morfin R (2006) Protection against dextran sodium sulfate-induced colitis by dehydroepiandrosterone and 7 $\alpha$ -hydroxy-dehydroepiandrosterone in the rat. *Steroids* **71**: 240–248.
- Pelissier MA, Marteau P & Pochart P (2007) Antioxidant effects of metronidazole in colonic tissue. *Digest Dis Sci* **52**: 40–44.
- Peterson DA, Frank DN, Pace NR & Gordon JI (2008) Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Cell Host Microbe* **3**: 417–427.
- Podolsky DK (2002) Inflammatory bowel disease. *New Engl J Med* **347**: 417–429.
- Pullan RD, Thomas GA, Rhodes M, Newcombe RG, Williams GT, Allen A & Rhodes J (1994) Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis. *Gut* **35**: 353–359.
- Rath HC, Schultz M, Freitag R, Dieleman LA, Li F, Linde HJ, Scholmerich J & Sartor RB (2001) Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice. *Infect Immun* **69**: 2277–2285.
- Rubinstein A & Tirosh B (1994) Mucus gel thickness and turnover in the gastrointestinal tract of the rat: response to cholinergic stimulus and implication for mucoadhesion. *Pharm Res* **11**: 794–799.
- Rutgeerts P, Hiele M, Geboes K, Peeters M, Penninckx F, Aerts R & Kerremans R (1995) Controlled trial of metronidazole treatment for prevention of Crohn's recurrence after ileal resection. *Gastroenterology* **108**: 1617–1621.
- Sartor RB (2000) Probiotics in chronic pouchitis: restoring luminal microbial balance. *Gastroenterology* **119**: 584–587.
- Sartor RB (2004) Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* **126**: 1620–1633.
- Sartor RB (2008) Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* **134**: 577–594.
- Satokari RM, Vaughan EE, Akkermans AD, Saarela M & de Vos WM (2001) Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microb* **67**: 504–513.
- Schultsz C, Van Den Berg FM, Ten Kate FW, Tytgat GN & Dankert J (1999) The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria compared with controls. *Gastroenterology* **117**: 1089–1097.
- Sedlak J & Lindsay RH (1968) Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* **25**: 192–205.

- Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, Sutren M, Pochart P, Marteau P, Jian R & Dore J (2003) Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* **52**: 237–242.
- Sepehri S, Kotlowski R, Bernstein CN & Krause DO (2007) Microbial diversity of inflamed and noninflamed gut biopsy tissues in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* **13**: 675–683.
- Sghir A, Gramet G, Suau A, Rochet V, Pochart P & Dore J (2000) Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microb* **66**: 2263–2266.
- Sherman P, Fleming N, Forstner J, Roomi N & Forstner G (1987) Bacteria and the mucus blanket in experimental small bowel bacterial overgrowth. *Am J Pathol* **126**: 527–534.
- Shirazi T, Longman RJ, Corfield AP & Probert CS (2000) Mucins and inflammatory bowel disease. *Postgrad Med J* **76**: 473–478.
- Smirnov A, Perez R, Amit-Romach E, Sklan D & Uni Z (2005) Mucin dynamics and microbial populations in chicken small intestine are changed by dietary probiotic and antibiotic growth promoter supplementation. *J Nutr* **135**: 187–192.
- Sokol H, Pigneur B & Watterlot L (2008) *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *P Natl Acad Sci USA* **105**: 16731–16736.
- Stecher B & Hardt WD (2008) The role of microbiota in infectious disease. *Trends Microbiol* **16**: 107–114.
- Strugala V, Allen A, Dettmar PW & Pearson JP (2003) Colonic mucin: methods of measuring mucus thickness. *P Nutr Soc* **62**: 237–243.
- Strugala V, Dettmar PW & Pearson JP (2008) Thickness and continuity of the adherent colonic mucus barrier in active and quiescent ulcerative colitis and Crohn's disease. *Int J Clin Pract* **62**: 762–769.
- Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD & Dore J (1999) Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microb* **65**: 4799–4807.
- Suchodolski JS, Xenoulis PG, Paddock CG, Steiner JM & Jergens AE (2010) Molecular analysis of the bacterial microbiota in duodenal biopsies from dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Vet Microbiol* **142**: 394–400.
- Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A *et al.* (2002) Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **122**: 44–54.
- Swidsinski A, Loening-Baucke V, Lochs H & Hale LP (2005) Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence *in situ* hybridization study in mice. *World J Gastroentero* **11**: 1131–1140.
- Swidsinski A, Sydora BC, Doerffel Y, Loening-Baucke V, Vanechoutte M, Lupicki M, Scholze J, Lochs H & Dieleman LA (2007) Viscosity gradient within the mucus layer determines the mucosal barrier function and the spatial organization of the intestinal microbiota. *Inflamm Bowel Dis* **13**: 963–970.
- Szentkuti L & Lorenz K (1995) The thickness of the mucus layer in different segments of the rat intestine. *Histochem J* **27**: 466–472.
- van der Waaij LA, Harmsen HJ, Madjipour M, Kroese FG, Zwiers M, van Dullemen HM, de Boer NK, Welling GW & Jansen PL (2005) Bacterial population analysis of human colon and terminal ileum biopsies with 16S rRNA-based fluorescent probes: commensal bacteria live in suspension and have no direct contact with epithelial cells. *Inflamm Bowel Dis* **11**: 865–871.
- Vasquez N, Mangin I, Lepage P *et al.* (2007) Patchy distribution of mucosal lesions in ileal Crohn's disease is not linked to differences in the dominant mucosa-associated bacteria: a study using fluorescence *in situ* hybridization and temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Inflamm Bowel Dis* **13**: 684–692.
- Vasquez N, Suau A, Magne F, Pochart P & Pelissier MA (2009) Differential effects of *Bifidobacterium pseudolongum* strain Patronus and metronidazole in the rat gut. *Appl Environ Microb* **75**: 381–386.
- Wallner G, Amann R & Beisker W (1993) Optimizing fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* **14**: 136–143.
- Willing B, Halfvarson J, Dicksved J, Rosenquist M, Järnerot G, Engstrand L, Tysk C & Jansson JK (2009) Twin studies reveal specific imbalances in the mucosa-associated microbiota of patients with ileal Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **15**: 653–660.
- Xenoulis PG, Palculict B, Allenspach K, Steiner JM, Van House AM & Suchodolski JS (2008) Molecular-phylogenetic characterization of microbial communities imbalances in the small intestine of dogs with inflammatory bowel disease. *FEMS Microbiol Ecol* **66**: 579–589.



# Publication N°2

**Title:** Metronidazole or Cotrimoxazole Therapy is Associated with a Decrease in Intestinal Bioavailability of Common Antiretroviral Drugs.

**Flore Dossou-Yovo**<sup>1</sup>, Godefroy Mamadou, Imar Djibrine Soudy, Nicolas Limas-Nzouzi, Joe Miantezila, **Jehan-François Desjeux** and Bruno Eto

**PLOS ONE/February 2014 /vol.9 /Issue 2 / e89943**

---

## Résumé

Le but de cette étude était d'évaluer l'effet de la prophylaxie par l'antibiothérapie chronique (Métronidazole – MTZ et Cotrimoxazole - CTX) sur la biodisponibilité intestinale des antirétroviraux (Atazanavir et le Ritonavir) chez le rat en chambre de perméation d'Ussing.

Les résultats montrent qu'après une prophylaxie chronique de 7 jours de traitement par voie orale des antibiotiques (MTZ et CTX), l'épaisseur de mucus augmente dans le colon proximal et distal respectivement, alors que la conductance électrique transépithéliale (qui est l'index de transport passive des ions) est réduite.

De plus on constate une augmentation de la sécrétion de l'Atazanavir (ATV) après prophylaxie aux antibiotiques MTZ et CTX de 2 et 4 fois respectivement dans le colon proximal et de 3 et 5 fois dans le colon distal. Avec le Ritonavir (RTV) la prophylaxie au MTZ et CTX provoque également une augmentation de sécrétion dans le colon proximal de 5 et 10 fois respectivement et dans le distal de 2 et 5 fois.

En conclusion après une thérapie au MTZ ou au CTX l'épaisseur de la couche de mucus augmente dans les deux cas. La perméabilité passive des ions et électrolytes est diminuée, ainsi que la biodisponibilité intestinale de deux antirétroviraux ATV et RTV.

# Metronidazole or Cotrimoxazole Therapy Is Associated with a Decrease in Intestinal Bioavailability of Common Antiretroviral Drugs

Flore Dossou-Yovo<sup>1</sup>, Godefroy Mamadou<sup>2</sup>, Imar Djibrine Soudy<sup>2,3</sup>, Nicolas Limas-Nzouzi<sup>2</sup>, Joe Miantezila<sup>2</sup>, Jehan-François Desjeux<sup>4</sup>, Bruno Eto<sup>2\*</sup>

**1** Laboratoire de Biologie, CNAM, Paris, France, **2** University of Paris Diderot - Paris 7, Faculty of Medicine Xavier Bichat, Laboratory TBC TransCell-Lab, Paris, France, **3** Institut Universitaire des Sciences et Technique d'Abéché, N'Djamena, Tchad, **4** Académie Nationale de Médecine, Paris, France

## Abstract

Metronidazole (MTZ) and Cotrimoxazole (CTX) are used in HIV/AIDS patients eligible for antiretroviral treatment. The objective of this animal study was to determine whether pre-treatment with antibiotics affects the intestinal bioavailability of Atazanavir (ATV) and Ritonavir (RTV). After oral administration of 1 mg MTZ and CTX for 7 days, the rat colonic mucosa were analyzed for mucus thickness or placed in Ussing chambers to measure ATV and RTV net transepithelial fluxes ( $J_{net}$ ). 1. In control rats, the mucus thickness was  $43.3 \pm 7.6 \mu\text{m}$  and  $40.7 \pm 6.9 \mu\text{m}$ , in proximal and distal colon, respectively. In proximal colon, the thickness was  $57.2 \pm 8.8$  and  $58.2 \pm 6.9 \mu\text{m}$  after MTZ and CTX, respectively whereas in distal colon, the thickness was  $121.1 \pm 38.4$  and  $170.5 \pm 35.0 \mu\text{m}$  ( $P < 0.05$ ) respectively. 2. Transepithelial conductance was reduced after MTZ or CTX in the proximal and distal colon. 3. In control, net ATV secretion was observed both in proximal ( $-0.36 \pm 0.02 \mu\text{g} \cdot \text{hr}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) and distal colon ( $-0.30 \pm 0.08 \mu\text{g} \cdot \text{hr}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ). After MTZ and CTX, it was increased in the proximal colon by two 2 fold and 4 fold, respectively and in the distal colon by 3 fold and 5 fold, respectively. 4. In control, there was no net active RTV transport either in proximal ( $+0.01 \pm 0.01 \mu\text{g} \cdot \text{hr}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) or distal colon ( $+0.04 \pm 0.01 \mu\text{g} \cdot \text{hr}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ). After MTZ and CTX, secretion was increased 5 fold and 10 fold, respectively, in the proximal colon and two fold and 5 fold, respectively in the distal colon ( $p < 0.001$ ). In conclusion, after MTZ and CTX therapy, the mucus layer was enlarged, passive permeability was decreased and ATV and RTV were actively secreted by the colonic epithelium suggesting that, in rat, the intestinal bioavailability of ATV and RTV is impaired after antibiotic therapy.

**Citation:** Dossou-Yovo F, Mamadou G, Soudy ID, Limas-Nzouzi N, Miantezila J, et al. (2014) Metronidazole or Cotrimoxazole Therapy Is Associated with a Decrease in Intestinal Bioavailability of Common Antiretroviral Drugs. PLoS ONE 9(2): e89943. doi:10.1371/journal.pone.0089943

**Editor:** Markus M. Heimesaat, Charité, Campus Benjamin Franklin, Germany

**Received:** October 27, 2013; **Accepted:** January 23, 2014; **Published:** February 26, 2014

**Copyright:** © 2014 Dossou-Yovo et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** The study was support by the budget of training of the laboratory TBC-Transcell-lab, faculty of medicine Xavier Bichat. University of Paris Diderot - paris7, France. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: bruno.eto@paris7.jussieu.fr

## Introduction

Atazanavir (ATV) is an azapeptide HIV-1 protease inhibitor (PI) and one of the antiretrovirals (ARV) used in second-line therapy in adults and adolescents with HIV infection according to the recommendations for a public health approach of the World Health Organization (WHO)'s 2010 guidelines. The oral bioavailability of ATV is low. Clinically, it is generally co-administered with Ritonavir (RTV), which stimulates ATV oral bioavailability by inhibiting cytochrome P450 (CYP) 3A, and P-glycoprotein (Pgp) via the same metabolic pathway [1,2].

Metronidazole (MTZ) and Cotrimoxazole (CTX) are two antibiotics commonly used in HIV/AIDS patients; in particular, in those with baseline CD4 counts close to that of patients eligible for antiretroviral treatment. CTX remains popular due to its low cost, effectiveness and familiarity among clinicians. It is the most common antibiotic prescribed to patients with urinary tract infections [3]. Other indications include treatment of infections caused by *Pneumocystis jirovecii* (Pj), *Toxoplasma gondii* (Tg), *Stenotrophomonas maltophilia* and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In addition, low-dose CTX is commonly used

for prophylaxis against opportunistic Pj and Tg infections [4] among patients with depressed CD4 counts. A recent study showed that MTZ therapy is associated with an increase of luminal mucus thickness in rats [5] pointing to a potential deleterious effect on the drug's intestinal bioavailability.

After oral administration, the intestinal bioavailability of solid forms depend on the aqueous solubility of the drug, the concentration of the dissolved drug and/or its permeability through the mucosal intestinal membrane. The mucus gel layer that coats the luminal epithelial layer is an unstirred aqueous layer and one of the main limiting factors to intestinal permeability [6,7,8,9]. This results in a decrease in drug concentration across the mucus thickness [10]. For example, a simultaneous decrease in luminal mucus and increase in intestinal permeability occurs during total parenteral nutrition [11] or following the administration of a mucolytic agent [7].

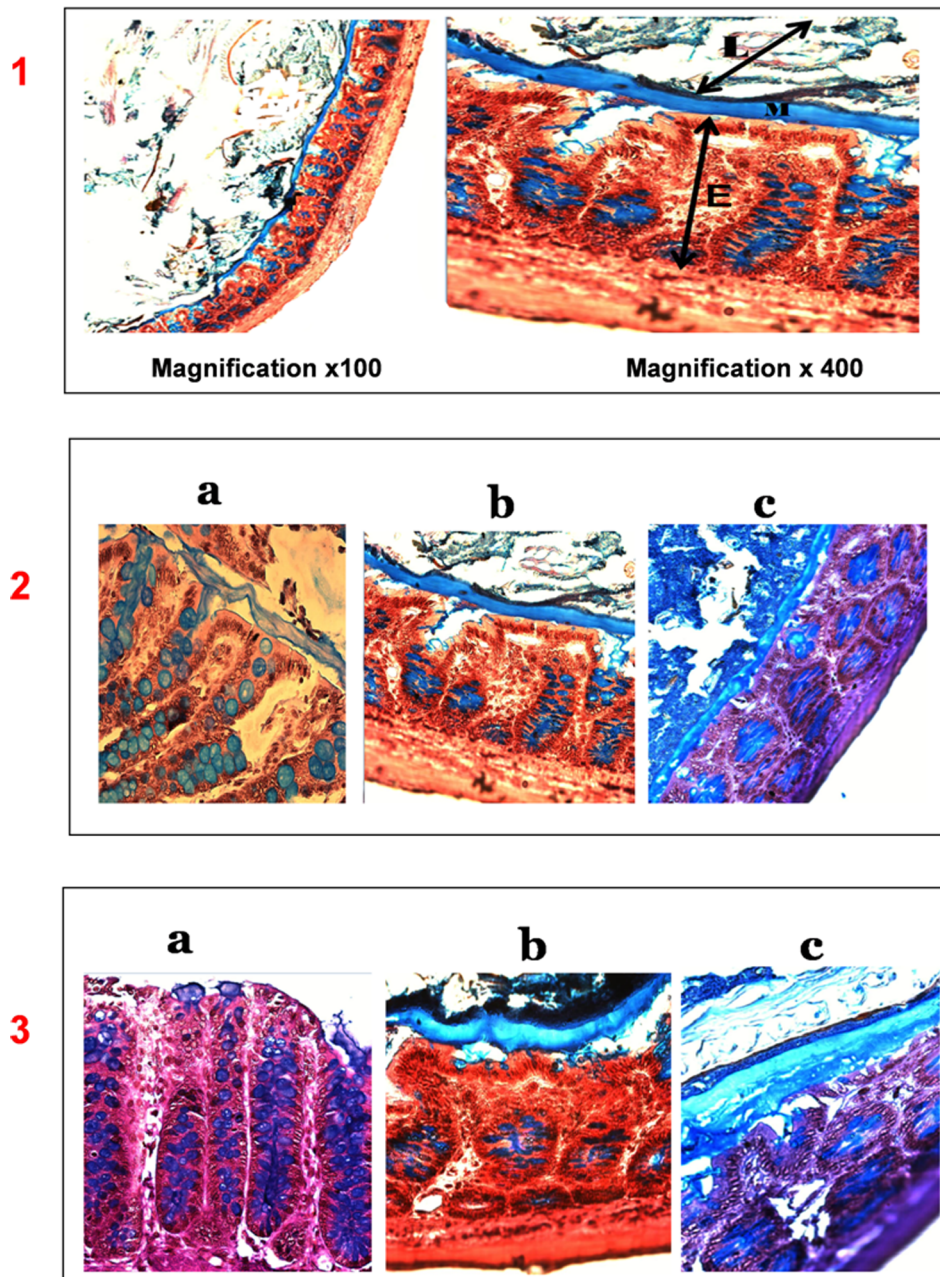
Thus, the aim of the study was to determine whether Metronidazole and Cotrimoxazole, that increase the mucus thickness, also alter the intestinal bioavailability of Atazanavir and Ritonavir, the most frequently prescribed antiretroviral drugs in first and second line therapy for Acquired Immune Deficiency

Syndrome (AIDS). To do so, the 3 main parameters of in vitro intestinal epithelial bioavailability were measured, namely: (1) variation of the mucus thickness, (2) the passive transmucosal permeability through electrical conductance, and (3) active transport through the net transepithelial fluxes of Atazanavir and Ritonavir.

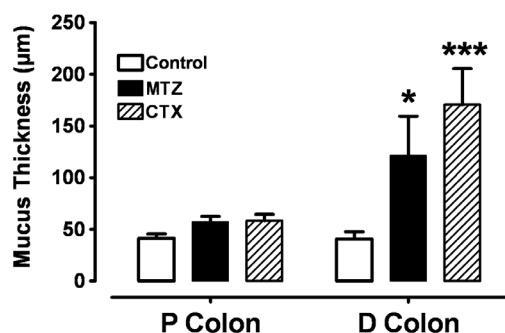
## Materials and Methods

### Chemicals

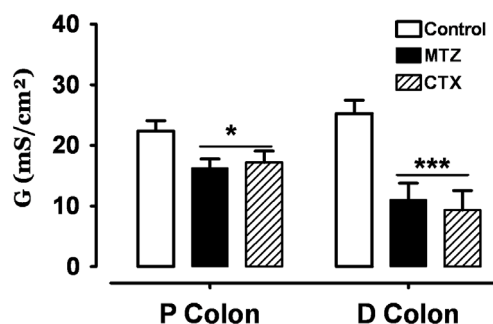
Atazanavir (Reyataz, Bristol-Myers Squibb Pharma) and Ritonavir (Norvir, Abbot Laboratories Limited), Trimethoprim-sulfamethoxazole or Cotrimoxazole (Bactrim, Roche, France) and Metronidazole (Flagyl, Sanofi-aventis, France) and Bumetanide (Sigma, St. Quentin-Fallavier, France) were commercially available. All other chemicals were analytic grade reagents.



**Figure 1. Thickness of the total mucus layer in colonic mucosa in proximal 2) and distal segments 3) of control a), Metronidazole b) and Cotrimoxazole-treated rats c), AB/PAS staining.** 1) Magnification x 100 and x 400. The total mucus thickness (M) was measured as a continuous layer between the luminal surface (L) and epithelium (E). Increased thickness of the mucus layer was observed in MTZ and CTX treated rats (b, c). Goblet cells are filled with mucus (blue arrows) either in the control or the MTZ and CTX treated group. Occasionally, a separation could be observed between the mucus layer and the epithelial surface, and may be due to the partial mucus shrinkage during the histological procedure [37]. doi:10.1371/journal.pone.0089943.g001



**Figure 2. Mucus thickness of colonic mucus (mean  $\pm$  SE) after 1 week pre-treatment with 1 mg of Cotrimoxazole (CTX) or 1 mg of Metronidazole (MTZ), compared to control in proximal and distal colon.** \* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$ ,  $n = 24$  tissues from 7 rats. doi:10.1371/journal.pone.0089943.g002



**Figure 3. Transepithelial electrical conductance ( $G$ ) (mean  $\pm$  SE) after 1 week of pre-treatment with 1 mg of Cotrimoxazole (CTX) or 1 mg of Metronidazole (MTZ) compared to controls, in proximal (A) and distal (B) colon.** \* $p < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ ,  $n = 24$  tissues from 7 rats. doi:10.1371/journal.pone.0089943.g003

### Antiretroviral Solution Preparation

Solutions were prepared according to the method of Ribière [12]. The sample weight (equivalent to two or four tablets or capsules, accurately weighed) was placed directly into a graduated flask with a little Ringer's solution, and magnetically stirred for 30 min. ATV was then diluted to the required volume with Ringer's and RTV with methanol 5% - Ringer's 95%. The solutions were centrifuged for 15 min. Fingerprints of each supernatant were performed with UV spectra for the control before storage at 18°C and use within one week.

### Animals

Mature male Sprague-Dawley rats, weighing 180–250 g, were obtained from Janvier SAS (Route des chênes, Le Genest-st-Isle, St Berthevin, France), housed in individual cages and fed with standard laboratory chow (UAR, Villemoisson s/Orge, France).

The study was conducted in accordance with the accepted principles outlined in the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" prepared by the National Academy of Sciences and published by the National Institutes of Health, and all efforts were made to minimize animal suffering and the number of animals used. Ethics approval was obtained from Paris Diderot University - Paris 7.

The studies were conducted in fasted animals. Food was withdrawn 18 hours before the experiments, although they had access to drinking water. The animals were then killed by CO<sub>2</sub> inhalation, and their colons were removed and rinsed free of intestinal content by flushing with ice-cold Ringer's solution. The animals' stomachs were empty. The issues were opened along the mesenteric border, and mounted as flat sheets between the two halves of acrylic Ussing chambers, as previously described. In this study, we selected the colon because CTX and MTZ are mainly used to target the colonic bacteria. In addition, it was reported that MTZ was found in human ascending colon after oral administration where it was partially metabolized [13]. The antibiotic treated animals received 1 mg CTX or 1 mg MTZ (per os) for 7 days prior to the experiment day.

### Thickness of the Mucus Layer

Colonic samples from the proximal and distal sections were used for these studies. The segments were immediately fixed in Carnoy's solution for 24 h at 4°C. The specimens were then paraffin-embedded, and up to 50 cross sections of 5 µm thickness were cut per block and mounted on slides according to the classical histological technique [5]. ACombined Alcian blue (AB) and

periodic acid Schiff reagent (PAS) protocole was used where the dyes are -specific for acidic and neutral mucins respectively. The principle consists demonstrating the presence of mucins and to clearly distinguish between acidic and neutral mucins. By first staining all acidic mucins with alcian blue, the acidic mucins, which are also PAS positive, will not react with the subsequent PAS reagent and only the neutral mucins are colored blue [14].

Paraffin was removed in xylene and sections were rehydrated for 3 min in 100%, 96% and 70% ethanol. Sections were stained with Alcian blue/periodic acid Schiff (AB/PAS) (1% AB 8GX in 3% acetic acid, pH 2.5) for 10 min. After washing in 3% acetic acid and deionized water, the sections were oxidized in 0.5% periodic acid for 5 min, and then washed with deionized water, dehydrated in 100% alcohol and mounted on slides with Eukitt (Kindler GmbH, Freiburg, Germany) to measure the adherent mucus layer thickness [15]. Slides were examined using a high-power oil immersion lens in a Leica microscope DFC 300FX. Images were taken with Leica FW 4000 software (Leica microsystemes SAS, Rueil-Malmaison, France). Mucus was the stained blue gel layer sandwiched between the epithelial area and the luminal contents.

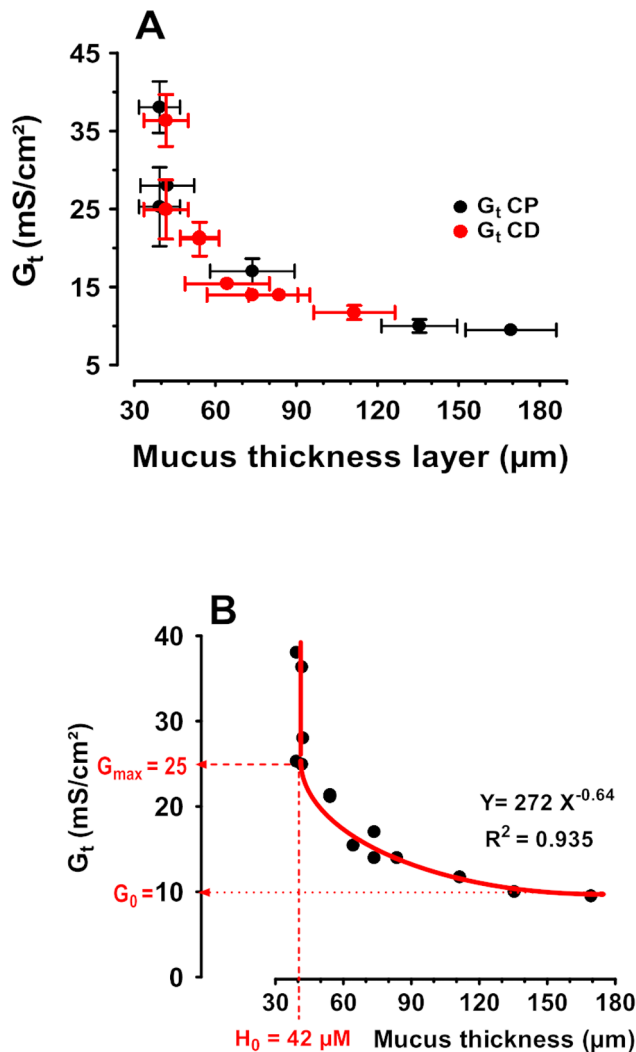
### Transepithelial Electrical Conductance

The isotonic Ringer's solution used throughout the experiments contained (in mM) 115 NaCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 1.2 CaCl<sub>2</sub>, 2.4 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 0.4 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. The pH was 7.40 at 37°C when bubbled with the 95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub> mixture used to circulate the chamber fluid. Ringer's solution was used in the two bathing reservoirs on each side of the colon defining the two compartments: mucosal (or luminal) and serosal (or blood side) compartments, separated by the colonic mucosa.

The spontaneous transmural electrical potential difference (PD) reflecting the asymmetry of electrical charges between the luminal and serosal colonic mucosa was measured via 3 M KCl solution in 4% (w/v) agar bridges. These bridges were placed on both sides of the tissue and connected to calomel half-cells, linked to a high-impedance voltmeter. PD was short-circuited and maintained at 0 mV throughout the experiment by a short-circuit current ( $I_{sc}$ ) via two stainless steel 316L working electrodes directly placed in each reservoir as described by Mathieu et al [16], in relation with an automatic voltage-clamp system (JFD-IV, Laboratoires TBC & Biomécatronics SAS, Ruitz, France).

Delivered  $I_{sc}$ , corrected for fluid resistance, was recorded continuously on a computer with Biodaqsoft software (Laboratoires TBC & Biomécatronics SAS, Ruitz, France). The  $I_{sc}$  (in





**Figure 4. Relationship between Mucus thickness (in µm) and Transepithelial electrical conductance  $G_t$  (in mS/cm<sup>2</sup>).** The data were obtained from the means of at least  $n = 13$  tissues from 7 rats. Closed black dots indicate proximal colon and closed red dots distal colon (A). The relationship between  $G_t$  and mucus thickness (ML) were analyzed by nonlinear regression (curve fit) using the power series equation  $Y = AX^B$  (B).  $r^2$  was 0.94. With 95% confidence limit if of A of 168.6 to 374.6 and B of  $-0.73$  to  $-0.55$ , with covariance Matrix A and  $B = -0.99$ . Below the threshold of  $42 \mu m$  the conductance (an index of ionic permeability) remained constant  $25 \text{ mS/cm}^2$ . In contrast, the conductance decreased with mucus thickness down to a limit value of  $10 \text{ mS/cm}^2$ .

doi:10.1371/journal.pone.0089943.g004

$\mu A/cm^2$ ) represents the sum of the net ion fluxes transported across the epithelium in the absence of an electrochemical gradient (mainly  $Na^+$ ,  $Cl^-$ , and  $HCO_3^-$ ). The transepithelial electrical conductance ( $G_t$ ) was calculated according to Ohm's law.  $G$  - reverse of resistance a permeability parameter was expressed in  $\text{mS/cm}^2$ .

#### Atazanavir and Ritonavir Transepithelial Fluxes

At the steady state of electrical parameters, tissues were paired according to their conductance value ( $\pm 20\%$ ). After  $I_{sc}$  stabilised, Ringer's solution containing Atazanavir (ATV, 1 mg) and Ritonavir (RTV, 1 mg) were then introduced at the same time into the serosal or the mucosal compartment of paired tissues. A 1-



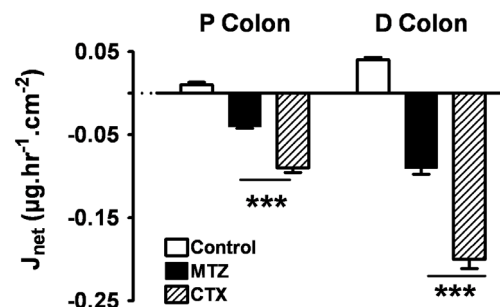
**Figure 5. ATV transepithelial net fluxes ( $J_{net}$ ) (mean  $\pm$  SE) after 1 week of pre-treatment with 1 mg of Cotrimoxazole (CTX), or 1 mg of Metronidazole (MTZ) compared to controls, in proximal and distal colon.** \*\*\* $p < 0.001$ ,  $n = 12$  tissues from 4 rats. Negative  $J_{net}$  indicates secretion from serosal (blood) to mucosal (luminal) side.

ml sample from the opposite compartment was withdrawn at 0, 60 and 120 min and replaced by 1 ml of Ringer's solution at  $37^\circ C$ . The ATV and RTV samples were then diluted with Ringer's solution to 3 ml for UV measurements at 237 nm and 240 nm, respectively, as described by Ribiere et al [12]. The effects of pre-treatment with MTZ or CTX on unidirectional mucosal-to serosal and serosal-to-mucosal ATV and RTV fluxes were determined during the steady state of transport (60–120 min). The net ATV and RTV fluxes were the differences between the opposite unidirectional fluxes obtained on paired tissues. Positive values indicate absorption from mucosa (luminal side) to serosa (blood side) across the epithelium while negative values indicate secretion.

The relationship between transepithelial electrical conductance ( $G_t$ ) and mucus thickness (MT) was analyzed using the "generate and stimulate curves" function of the Graphpad Prism 5 program (San Diego, CA, USA).

#### Statistics

The data are expressed as a mean  $\pm$  standard error (SE),  $n$  = number of tissues of at least 3 rats. The statistical analyses were obtained by two way analysis of variance (ANOVA), using as source of variation treatment (MTZ, CTX) and tissue (distal and proximal colon) followed by the Bonferroni post-tests (Graphpad software for Windows version 5. Graphpad, San Diego, CA, USA).  $P < 0.05$  was considered as significant.



**Figure 6. RTV transepithelial net fluxes ( $J_{net}$ ) (mean  $\pm$  SE) after 1 week of pre-treatment with 1 mg of Cotrimoxazole (CTX) or 1 mg of Metronidazole (MTZ) compared to controls, in proximal and distal tissues.** \*\*\* $p < 0.001$ ,  $n = 12$  tissues of 4 rats.

doi:10.1371/journal.pone.0089943.g006

## Results

### Mucus Thickness (MT)

Pre-treatment of animals with antibiotics resulted in an increase in intestinal thickness of mucus in proximal and distal colon (fig. 1 and 2). In the proximal colon, after one week of MTZ or CTX treatment the thickness of mucus was  $57.2 \pm 8.8 \mu\text{m}$  and  $58.2 \pm 6.9 \mu\text{m}$ , respectively, vs.  $43.3 \pm 7.6 \mu\text{m}$  in controls, but the increase was not statistically significant. In the distal colon, it was  $121.1 \pm 38.4 \mu\text{m}$  and  $170.5 \pm 35.0 \mu\text{m}$  respectively, vs.  $40.6 \pm 6.9 \mu\text{m}$  in controls.

### Transepithelial Electrical Conductance

Transepithelial conductance ( $G_t$ ) was decreased after one week of treatment with MTZ or CTX in the proximal and distal colon. In controls, the conductance ( $G_t$ ) was  $22.4 \pm 1.7$  in proximal colon and  $25.3 \pm 3.7 \text{ mS/cm}^2$  in distal colon (fig. 3); whereas one week after MTZ or CTX treatment the conductance was more reduced in the distal colon than in proximal colon. In the proximal colon it was  $16.3 \pm 1.7 \text{ mS/cm}^2$  with MTZ and  $17.2 \pm 1.8 \text{ mS/cm}^2$  with CTX. In the distal colon, it was  $11.1 \pm 3.8$  with MTZ and  $9.3 \pm 3.3 \text{ mS/cm}^2$  with CTX.

### Relationship between Transepithelial Electrical Conductance ( $G_t$ ) and Mucus Thickness (MT)

The relationship was highly significant ( $r^2 = 0.94$ ). Interestingly, the data obtained on proximal and distal colon did not depart from each other (fig. 4A). Thus, the analysis was performed with the combined data (fig. 4B). The best fit is a power series relationship  $Y = AX^B$ , ( $G_t = 272 \text{ MT}^{-0.64}$ ).

### ATV and RTV Net Transepithelial Fluxes

In proximal and distal colon, pre-treatment of rats with both MTZ and CTX reduced the transepithelial intestinal bioavailability of ATV. In proximal colon, there was a net secretion ( $-0.36 \pm 0.02 \mu\text{g}\cdot\text{hr}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) in controls. Secretion was significantly increased after MTZ or CTX:  $-0.85 \pm 0.05 \mu\text{g}\cdot\text{hr}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  and  $-1.50 \pm 0.09 \mu\text{g}\cdot\text{hr}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ , respectively ( $P < 0.001$ ) (fig. 5). Similarly, in the distal colon, there was a net secretion in controls ( $-0.30 \pm 0.08 \mu\text{g}\cdot\text{hr}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). This was significantly increased after MTZ or CTX:  $-0.95 \pm 0.06 \mu\text{g}\cdot\text{hr}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  ( $p < 0.05$ ) and  $-1.56 \pm 0.31 \mu\text{g}\cdot\text{hr}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  ( $P < 0.001$ ), respectively (fig. 5).

RTV secretion was also stimulated although to a lesser extent compared to ATV. In the proximal colon, in controls, there was no net transport ( $+0.01 \pm 0.01 \mu\text{g}\cdot\text{hr}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). A significant secretion was observed after MTZ or CTX:  $-0.04 \pm 0.01 \mu\text{g}\cdot\text{hr}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  ( $P < 0.001$ ) and  $-0.09 \pm 0.02 \mu\text{g}\cdot\text{hr}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  ( $P < 0.001$ ), respectively (fig. 6).

In the distal colon, in controls, there was almost no net transport ( $+0.04 \pm 0.01 \mu\text{g}\cdot\text{hr}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). A significant secretion was observed after MTZ or CTX:  $-0.09 \pm 0.03 \mu\text{g}\cdot\text{hr}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  ( $P < 0.001$ ) and  $-0.20 \pm 0.04 \mu\text{g}\cdot\text{hr}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  ( $P < 0.001$ ) respectively (fig. 6).

## Discussion

The present study confirms that 7 days of 1 mg Cotrimoxazole (CTX) or metronidazole (MTZ) therapy induced an increase in the thickness of the mucus gel layer that coats the luminal surface of rat colonic epithelium [5]. In addition, it indicates that the increased thickness of the mucus layer was associated with a decrease in transepithelial conductance, a non-specific marker of small water-soluble molecule permeability. Antibiotic therapy was also associated with an increase in active secretion of both antiretroviral drugs to the luminal side, although it was more

pronounced with ATV than with RTV. Taken together, the present results are consistent with a decrease in intestinal colonic mucosal bioavailability of two major anti-retroviral drugs after 7 days of therapy with two frequently used antibiotics CTX and MTZ. This could be explained, at least in part, by an increase in thickness of the mucus covering the epithelial layer contributing to a decrease in passive diffusion and by the stimulation of an active drug secretion by the epithelium.

The colonic epithelium is covered with mucus, a gel-like fluid containing mainly water (90–98%) and mucin (2–5%). This aqueous gel-like matrix forms an unstirred water layer (UWL) creating an aqueous diffusion barrier that hampers drug permeation [17]. For many solutes, crossing the mucus layer is associated with a reduction in effective diffusion coefficients, and with retardation of passive diffusion solute fluxes [18,19]. Variability in small solute passive diffusion is frequently explored by measurements of an alteration of transepithelial electrical conductance. This method is based on the observation of a linear relationship between conductance and transepithelial flux of small water-soluble molecules, including sodium chloride (MW 58), xylose (MW 150), mannitol (MW 182), or polyethylene glycol (MW 2000) [20,21]. Thus, the present finding of a significant reduction in conductance after 7 days of antibiotic exposure is consistent with a reduction in active ATV and RTV permeability.

In addition, from the relationship between mucus thickness and conductance it can be postulated that the passive permeability of many drugs of small molecular weight may be altered by agents that modulate mucus thickness. Below approx.  $40 \mu\text{m}$ , the conductance remains constant, suggesting that the remaining mucus is part of the epithelial functional entity. In addition, when the mucus layer is thicker than  $40 \mu\text{m}$  the conductance is reduced following the equation  $G_t = 272 \text{ MT}^{-0.64}$ . In the present study, increasing this part of the mucus layer by threefold, from  $40$  to  $160 \mu\text{m}$ , was associated with a conductance decrease of more than half. It remains to be seen if such a relationship is also present with other small-molecular-weight water-soluble drugs.

The observed increased active secretion of ATV and RTV after CTX and MTZ further suggests that the antibiotics may not only decrease passive diffusion but also stimulate active transport system(s), both contributing to decreasing the bioavailability of the retroviral drugs. The Ussing chamber apparatus was essentially designed to study active transport across an epithelial layer [22], including the colonic epithelial layer [23]. In controls, ATV was actively secreted into the luminal compartment and no active transport of RTV was observed. In contrast active secretion was greatly increased after antibiotic treatment, although less pronounced with RTV than with ATV. This finding suggests that the cellular epithelial transporters that secrete xenobiotics are stimulated by antibiotics. Part of the observed secretion may be related to a decrease in ARV drug concentration at the surface of the epithelial cells due to the increased UWL, depending on the  $K_m$  of the specific transporter(s). It also points to the potential stimulation of the ATP-binding cassette transporters that are known to secrete antiretroviral drugs [24,25]. The in vivo oral bioavailability of ATV is low. In patients, it is generally co-administered with RTV because RTV stimulates oral ATV bioavailability by inhibiting cytochrome P450 (CYP) 3A, and P-glycoprotein (Pgp) via the same metabolic pathway [1,2]. In addition, it has also been reported that chronically used RTV is not only a powerful protease inhibitor, but an efficient inducer of CYP3A and Pgp [26,27]. The opposing actions of RTV and ATV on bioavailability modulators may be further altered by the effects of commonly used of antibiotics. In this animal study ATV was used concomitantly with RTV in order to mimic clinical usage.

We did not study other mechanisms by which antibiotics could alter the intestinal bioavailability of anti-retroviral drugs. However, several additional mechanisms may be involved: For example, the bacteria that are retained in the mucus may also directly influence epithelial properties. In the colon, the mucus layer provides a hospitable environment for the microbiota, where the host and bacteria benefit from a symbiotic relationship [28,29,30]. Recently, an increase in bifidobacteria and enterobacteria was found in metronidazole-treated rats compared with control rats [5]. This was associated with a decrease in oxidative stress, a condition that is associated with alterations in intestinal epithelial transport properties [31]. In rat, gut microbiota and dietary composition have been shown to affect the secretory pattern of intestinal mucins. In the small intestine, the effect of diet was more pronounced, whereas in the large intestine the microbiota was the main modulator [5,28,32,33]. Therefore, variations in terms of mucus thickness may not only be linked to internal physiological factors but also to external factors. In this study, the externally acting factors were the antibiotics (CTX and MTZ).

In addition, impaired or aberrant mucus production is often associated with an inflammatory reaction, including in inflammatory bowel diseases [34,35]. In turn, mucosal inflammation is associated with altered intestinal epithelial permeability properties [34,36]. In the present study, we did not specifically explore the relative roles of oxidative stress and immune response in the

observed decreased passive diffusion and increased active transport.

In conclusion, this study clearly shows that CTX and MTZ, often prescribed to HIV patients in Sub-Saharan Africa, as a prophylaxis of opportunistic infections, induced a reduction the *in vitro* bioavailability of ATV and RTV in rat colon. Complementary studies in humans are necessary to confirm this observation. This study suggests that the reduction of the oral bioavailability of ARVs must be taken in account after CTX and MTZ. The reduction of systemic drug concentrations, particularly proteases inhibitors, during treatment can be one of the factors favouring HIV drug resistance, particularly in developing countries. If true, substitution of CTX or MTZ by other molecules, including immuno-modulating medicines may be an alternative in the prophylaxis of opportunistic infections.

## Acknowledgments

We thank Dr Alison Foote (Grenoble Clinical Research Centre, France) for English editing.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: BE FDY JFD. Performed the experiments: FDY BE GM IDS NLN JFD JM. Analyzed the data: FDY BE JFD NLN. Contributed reagents/materials/analysis tools: FDY BE. Wrote the paper: BE JFD JFDY.

## References

- Vogel M, Voigt E, Michaelis HC, Sudhop T, Wolff M, et al. (2004) Management of drug-to-drug interactions between cyclosporine A and the protease-inhibitor lopinavir/ritonavir in liver-transplanted HIV-infected patients. *Liver Transpl* 10: 939–944.
- Crommentuyn KM, Mulder JW, Sparidans RW, Huitema AD, Schellens JH, et al. (2004) Drug-drug interaction between itraconazole and the antiretroviral drug lopinavir/ritonavir in an HIV-1-infected patient with disseminated histoplasmosis. *Clin Infect Dis* 38: e73–75.
- McIsaac WJ, Prakash P, Ross S (2008) The management of acute uncomplicated cystitis in adult women by family physicians in Canada. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 19: 287–293.
- Kaplan JE, Benson C, Holmes KH, Brooks JT, Pau A, et al. (2009) Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. *MMWR Recomm Rep* 58: 1–207; quiz CE201–204.
- Pelissier MA, Vasquez N, Balamurugan R, Pereira E, Dossou-Yovo F, et al. (2010) Metronidazole effects on microbiota and mucus layer thickness in the rat gut. *FEMS Microbiol Ecol* 73: 601–610.
- Iiboshi Y, Nezu R, Khan J, Chen K, Cui L, et al. (1996) Developmental changes in distribution of the mucous gel layer and intestinal permeability in rat small intestine. *JPN J Parenter Enter Nutr* 20: 406–411.
- Iiboshi Y, Nezu R, Cui L, Chen K, Khan J, et al. (1996) Adhesive mucous gel layer and mucus release as intestinal barrier in rats. *JPN J Parenter Enter Nutr* 20: 98–104.
- Thomson AB, Dietschy JM (1980) Intestinal kinetic parameters: effects of unstirred layers and transport preparation. *Am J Physiol* 239: G372–377.
- Tai YH, Tai CY (1981) The conventional short-circuiting technique under short-circuits most epithelia. *J Membr Biol* 59: 173–177.
- Chiou WL (1996) New perspectives on the theory of permeability and resistance in the study of drug transport and absorption. *J Pharmacokin Biopharm* 24: 433–442.
- Iiboshi Y, Nezu R, Kennedy M, Fujii M, Wasa M, et al. (1994) Total parenteral nutrition decreases luminal mucous gel and increases permeability of small intestine. *JPN J Parenter Enter Nutr* 18: 346–350.
- Rebiere H, Mazel B, Civate C, Bonnet PA (2007) Determination of 19 antiretroviral agents in pharmaceuticals or suspected products with two methods using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 850: 376–383.
- Vertzoni M, Carlsson A, Abrahamsson B, Goumas K, Reppas C (2011) Degradation kinetics of metronidazole and olsalazine by bacteria in ascending colon and in feces of healthy adults. *Int J Pharm* 413: 81–86.
- Cook HC (1973) A histochemical characterization of malignant tumour mucins as a possible aid in the identification of metastatic deposits. *Med Lab Technol* 30: 217–224.
- Pelissier MA, Muller C, Hill M, Morfin R (2006) Protection against dextran sodium sulfate-induced colitis by dehydroepiandrosterone and 7 $\alpha$ -hydroxy-dehydroepiandrosterone in the rat. *Steroids* 71: 240–248.
- Mathieu J, Mamar S, Eto B (2008) Automated measurement of intestinal mucosa electrical parameters using a new digital clamp. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 30: 591–598.
- Cone RA (2009) Barrier properties of mucus. *Adv Drug Deliv Rev* 61: 75–85.
- Desai MA, Nicholas CV, Vadgama P (1991) Electrochemical determination of the permeability of porcine mucus to model solute compounds. *J Pharm Pharmacol* 43: 124–127.
- Korjamo T, Heikkinen AT, Monkkonen J (2009) Analysis of unstirred water layer in *in vitro* permeability experiments. *J Pharm Sci* 98: 4469–4479.
- Dawson DC, Cooke AR (1978) Parallel pathways for ion transport across rat gastric mucosa: effect of ethanol. *Am J Physiol* 235: E7–15.
- Heyman M, Dumontier AM, Desjeux JF (1980) Xylose transport pathways in rabbit ileum. *Am J Physiol* 238: G326–331.
- Ussing HH (1949) The active ion transport through the isolated frog skin in the light of tracer studies. *Acta Physiol Scand* 17: 1–37.
- Varum FJ, Veiga F, Sousa JS, Basit AW (2011) Mucus thickness in the gastrointestinal tract of laboratory animals. *J Pharm Pharmacol* 64: 218–227.
- Zembruski NC, Buchel G, Jodicke L, Herzog M, Haefeli WE, et al. (2011) Potential of novel antiretrovirals to modulate expression and function of drug transporters *in vitro*. *J Antimicrob Chemother* 66: 802–812.
- Rodriguez-Novoa S, Barreiro P, Jimenez-Nacher I, Soriano V (2006) Overview of the pharmacogenetics of HIV therapy. *Pharmacogenomics* 7: 234–245.
- Perloff MD, Von Moltke LL, Marchand JE, Greenblatt DJ (2001) Ritonavir induces P-glycoprotein expression, multidrug resistance-associated protein (MRP1) expression, and drug transporter-mediated activity in a human intestinal cell line. *J Pharm Sci* 90: 1829–1837.
- Kageyama M, Namiki H, Fukushima H, Terasaka S, Togawa T, et al. (2005) Effect of chronic administration of ritonavir on function of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein in rats. *Biol Pharm Bull* 28: 130–137.
- Johansson ME, Larsson JM, Hansson GC (2011) The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 Suppl 1: 4659–4665.
- Linden SK, Florin TH, McGuckin MA (2008) Mucin dynamics in intestinal bacterial infection. *PLoS One* 3: e3952.
- McGuckin MA, Linden SK, Sutton P, Florin TH (2011) Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat Rev Microbiol* 9: 265–278.
- Darmon N, Pelissier MA, Heyman M, Albrecht R, Desjeux JF (1993) Oxidative stress may contribute to the intestinal dysfunction of weanling rats fed a low protein diet. *J Nutr* 123: 1068–1075.
- Sharma R, Schumacher U, Ronaasen V, Coates M (1995) Rat intestinal mucosal responses to a microbial flora and different diets. *Gut* 36: 209–214.
- Sharma R, Schumacher U (1995) Morphometric analysis of intestinal mucins under different dietary conditions and gut flora in rats. *Dig Dis Sci* 40: 2532–2539.

34. Belkaid Y, Grainger J (2013) Immunology. Mucus coat, a dress code for tolerance. *Science* 342: 432–433.
35. Larsson JM, Karlsson H, Crespo JG, Johansson ME, Eklund L, et al. (2011) Altered O-glycosylation profile of MUC2 mucin occurs in active ulcerative colitis and is associated with increased inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 17: 2299–2307.
36. Heyman M, Desjeux JF (2000) Cytokine-induced alteration of the epithelial barrier to food antigens in disease. *Ann N Y Acad Sci* 915: 304–311.
37. Ota H, Katsuyama T (1992) Alternating laminated array of two types of mucin in the human gastric surface mucous layer. *Histochem J* 24: 86–92.



## **PARTIE 4: Discussion générale**

## Discussion

L'objectif principal de ce travail est la mise au point d'un promoteur de l'absorption intestinale des médicaments à faible biodisponibilité, dénué de toute toxicité. L'objectif secondaire c'est que ce promoteur d'absorption de médicament puisse agir à la fois sur la solubilisation des principes actifs, la couche d'eau non agitée, les transporteurs transmembranaires et sur la voie paracellulaire pour s'assurer d'une large utilisation.

Pour atteindre cet objectif nous avons deux hypothèses principales de travail. La première consistait à utiliser à la fois des promoteurs de l'absorption des médicaments d'origine chimique connus qui agissent sur la solubilisation des principes actifs associés à ceux qui agissent sur la couche d'eau non agitée d'une part et d'autre part de faire intervenir, ceux qui agissent sur les transporteurs transmembranaires des xénobiotiques. On aurait ainsi une composition contenant plusieurs produits chimiques différents. Mais cette solution était très difficile à mettre en œuvre tant sur sa conception que sur sa réalisation et ceci pour plusieurs raisons:

La majorité des produits connus pour agir sur le passage des xénobiotiques au travers de la barrière intestinale sont eux-mêmes utilisés comme médicaments car disposent des propriétés pharmacologiques [129, 221].

Mélanger plusieurs médicaments ou principes actifs suppose qu'on maîtrise parfaitement les interactions éventuelles entre ces différents produits chimiques. Or notre équipe n'a aucune expérience dans la chimiothérapie alternative et combinatoire (CAC).

La deuxième hypothèse de travail était de procéder à la mise au point d'une composition pharmaceutique et ou diététique contenant cette fois plusieurs extraits de plantes connus pour agir sur la modification de la perméabilité intestinale. Cette hypothèse de travail consistait à l'utilisation d'une polyphytothérapie alternative et combinatoire (PPAC).

C'est cette dernière hypothèse qui a été retenue, car parmi les membres de nos équipes et collaboration on peut noter une longue expérience dans le développement des biophytomédicaments [222, 223] en utilisant la PPAC [167] grâce au concept de l'approche fonctionnelle.

Dans la première partie de ce travail (Brevet- Article 1), nous avons utilisé les extraits d'une plante autorisée en ventre libre par le ministère de la santé et connue pour ses nombreuses vertus médicinales, *l'hibiscus sabdariffa* ou karkaté. C'est à partir de l'extrait aqueux obtenu par extraction subcritique puis mis en poudre par atomisation que nous avons préparé la solution de base de la formule F2 qui a été utilisée dans cette étude. La composition de base combinée ou alternée avec d'autres produits a permis de moduler l'effet biologique obtenu.

Dans la deuxième partie de ce travail (article 1 acceptée & article 2 soumis), nous montrons l'importance et le rôle de la couche d'eau non agitée plus spécifiquement le mucus dans le processus de transport des xénobiotiques au travers de la barrière intestinale.

### *Brevet*

Dans le brevet la première revendication est la suivante : Composition comprenant un extrait d'*Hibiscus Sabdariffa*, utilisée pour augmenter le passage des xénobiotiques, des médicaments et des nutriments au travers des barrières biologiques.

En effet, la formulation selon l'invention (F2) provoque une augmentation de la conductance au niveau de l'intestin de rat. Cette augmentation est dose dépendante (figure 1 brevet) et réversible. Ce résultat montre que F2 agit sur le transport passif car la conductance est l'index qui permet d'évaluer le passage passif des xénobiotiques au travers de l'épithélium intestinal. Il est bien connu que les extraits de certaines plantes pouvaient moduler la perméabilité intestinale par le biais de la réduction de la résistance transcellulaire (augmentation de la conductance). C'est le cas de l'extrait de *Sinomenium acutum* [224]. L'alcaloïde extrait de la plante induit une diminution (dose dépendante) de la résistance électrique transépithéliale (TEER) des cellules CaCo-2. Il favorise également une augmentation du transport de plusieurs composés (cimétidine, vitamine C, rutine, lutéoline et de l'insuline). L'action de F2 sur la voie paracellulaire est confirmée ici par son action sur le passage fluorescéine isothiocyanate-Dextran 4000 (FD4).

La figure 5A et 5B du brevet montre que lorsque F2 est introduit simultanément dans le côté muqueux en chambre de perméation d'Ussing, le passage (le flux net) de FD4 est augmenté. La FD4 est un indicateur du passage paracellulaire comme le mannitol.

Dans l'article 1 (Brevet), les résultats (Figure 6A et 6B) montrent que F2 modifie la perméabilité non seulement de FD4, mais aussi des anticancéreux les plus utilisés en chimiothérapie à savoir l'oxaliplatine et le cisplatine. Nous avons pu établir une bonne corrélation entre le flux net de ces deux anticancéreux et le mannitol et la FD4 (nous avons utilisé le mannitol marqué au carbone 14 (<sup>14</sup>C), communication personnelle Eto). Le mannitol est l'un des marqueurs de la voie paracellulaire tout comme la FD4. Ces résultats suggèrent qu'au moins une partie de l'augmentation du passage des xénobiotiques induit par la F2 se fait par la voie paracellulaire probablement par la réduction de la résistance membranaire.

La modulation de la voie paracellulaire (ouverture des jonctions serrées) n'exclut pas une action au niveau de la voie transcellulaire. La Cimétidine est citée parmi les produits pour lesquels, l'extrait de la *sinomenium acutum* augmente le passage transmembranaire. Or la Cimétidine est un substrat de la P-gp. La P-gp, pompe à efflux, transmembranaire, ATP-ase énergie dépendante, joue un rôle physiologique

majeur dans l'absorption, la distribution et l'excrétion des xénobiotiques. Sa fonction de barrière biochimique consiste à limiter l'entrée des xénobiotiques et à jouer un rôle d'aspirateur afin de purger les différents organes ou la circulation systémique [128].

Les résultats de la figure 2 montrent le passage des antirétroviraux (ARVs) seuls au travers de l'intestin de rat en fonction du temps. Cette figure montre que le passage de l'Efavirenz (EFV) est supérieur à celui de l'Atazanavir (ATV). En présence de F2 la cinétique de passage des ARVs est totalement modifiée. Ce résultat montre l'effet de F2 sur la cinétique de passage des ARVs au travers de la barrière intestinale. Le fait que F2 modifie non seulement la cinétique de passage des ARVs mais aussi le flux proprement dit suggère l'action de F2 sur le transport actif des ARVs, car la modification du flux est un indicateur du transport actif.

Les résultats obtenus avec F2 montrent bien que la composition agit non seulement sur le passage des xénobiotiques au travers de la barrière intestinale en modifiant le passage paracellulaire, mais aussi le passage transcellulaire, ce qui suggèrent que la composition peut être utilisée:

- pour augmenter le passage des xénobiotiques, des médicaments et des nutriments au travers des barrières biologiques.
- en tant qu'adjuvant de médicament pour la facilitation et l'augmentation du transport des médicaments au travers des barrières biologiques,
- en tant qu'excipient pour favoriser le passage des médicaments au travers des barrières biologiques,
- pour augmenter la biodisponibilité par voie orale des vitamines, des nutriments, des oligoéléments et les sels minéraux.
- pour augmenter le passage de traceurs biologiques au travers des barrières biologiques pour faire le diagnostic médical et l'exploration fonctionnelle.

#### *Article 1 (publication)*

Dans la deuxième partie de ce travail, l'objectif principal était focalisé sur l'importance et le rôle de la couche d'eau non agitée plus principalement sur le mucus dans le processus de transport des xénobiotiques au travers de la barrière intestinale.

Pour y arriver nous nous sommes basé sur les travaux antérieurs qui montrent que l'administration chronique du Métronidazole chez le rat provoque une augmentation de la couche du mucus au niveau du côlon [191].

Dans ces travaux, nous avons montré que l'administration du Metronidazole par le biais de l'eau de boisson des rats sains à raison de 1 mg/mL pendant 7 jours provoque non seulement le doublement de l'épaisseur de la couche de mucus deux

fois plus par rapport au contrôle, mais aussi une modification de la flore microbienne du côlon. La flore microbienne devient majoritairement composée de *Bifidobacterium pseudolongum*. Le Métronidazole est utilisé dans le traitement du syndrome de l'intestin irrité (IBS). On suggère que le bénéfice clinique qu'apporte cet antibiotique serait dû à son action sur la composition de la flore microbienne intestinale en favorisant sa colonisation par les Bifidobactéries responsables de la production du mucus. Ce mucus aurait un rôle protecteur du tube digestif car réduit le stress oxydatif basal des protéines de l'intestin et principalement au niveau du côlon.

## *Article 2 (publication)*

Nous avons repris les travaux de l'article 2 en y apportant des modifications. La première modification consiste à gaver les animaux au lieu de leur donner les antibiotiques dans les biberons. Cette modification méthodologique permet de s'assurer que les rats prennent le traitement à administrer. Les travaux antérieurs ont montré une grande disparité dans la prise des antibiotiques. La deuxième modification est l'ajout du Cotrimoxazole (CTX) en plus du Métronidazole (MTX). Cet antibiotique est le plus utilisé en prophylaxie contre les infections opportunistes des personnes vivant avec le VIH.

Après une semaine de traitement l'on observe une augmentation de l'épaisseur du mucus au niveau du côlon proximal et distal suite à l'administration des deux antibiotiques. L'administration par gavage du MTX a induit une augmentation de l'épaisseur du mucus 3 fois plus dans le côlon distal par rapport aux témoins alors que l'administration dans la boisson du MTX avait provoqué une augmentation de l'épaisseur de mucus de 2 fois plus par rapport aux valeurs observées chez les rats témoins. Le CTX dans les mêmes conditions provoque une augmentation de l'épaisseur du mucus 4 fois plus que dans les animaux témoins.

Ensuite nous voulions savoir si le fait d'augmenter l'épaisseur du mucus au niveau du côlon modifiait la biodisponibilité intestinale des antirétroviraux les plus usuels surtout ceux recommandés par l'organisation mondiale de la santé en première ligne de traitement.

Les résultats obtenus chez le rat montrent que l'antibiothérapie chronique provoque une augmentation de l'épaisseur du mucus au niveau du côlon ce qui réduit considérablement la biodisponibilité intestinale des ARVs utilisés dans cette étude Efavirenz (EFV), Atazanavir (ATV).

Ces résultats sont d'une grande importance car dans les pays en voie de développement l'antibiothérapie est systématiquement prescrite par les cliniciens en prophylaxie contre les infections opportunistes au VIH/SIDA.

L'étude préliminaire de cas rapportés, effectuée au Cameroun (Communication personnelle Eto) montre que la fréquence de la résistance aux ARVs ainsi que les échecs thérapeutiques (Efavirenz, Atazanavir) sont plus fréquents chez les patients

ayant subi une antibiothérapie chronique au CTX avant l'éligibilité aux ARVs. De surcroît, ces personnes continuent à prendre ces antibiotiques au cours du traitement aux ARVs.

Ce travail montre avec clarté que la couche d'eau non agitée qui est essentiellement composée du mucus et d'eau peut être un facteur limitant dans la biodisponibilité orale des médicaments et des xénobiotiques.

Ce travail pour être complet doit se poursuivre par les études des effets des différentes formulations selon l'invention du brevet 1 sur la perméabilité intestinale en présence des couches de mucus modifiées chez le rat. Le but étant de vérifier si F2 ainsi que les formulations dérivées peuvent également favoriser le passage des xénobiotiques au travers de la couche de mucus modifiée et par conséquent au travers de la couche d'eau non agitée.

## **PARTIE 5: Conclusions et perspectives**

## Conclusions et perspectives

L'objectif principal de ce travail était la mise au point d'un promoteur de l'absorption des médicaments de faible biodisponibilité dénué de toute toxicité.

L'objectif secondaire était que ce promoteur d'absorption de médicament puisse agir à la fois sur la solubilisation des principes actifs, la couche d'eau non agitée, les transporteurs transmembranaires et sur la voie paracellulaire pour s'assurer d'une large utilisation.

Les objectifs de ce travail sont en grande partie atteints. Grâce à une composition pharmaceutique (F2) obtenue à partir des extraits de plante, nous avons montré que l'on peut aisément augmenter le passage intestinal des médicaments à faible biodisponibilité chez l'animal de laboratoire comme les anticancéreux et les antirétroviraux. Le plus important c'est que cette composition pharmaceutique agit à la fois sur la voie paracellulaire en modifiant la conductance (index du transport transmembranaire passif), et sur la voie transcellulaire en modifiant la perméabilité (le flux) des xénobiotiques (index du transport transmembranaire actif).

La composition pharmaceutique selon l'invention n'est pas toxique, mais toutefois pour avoir un promoteur d'absorption de médicaments idéal, il serait souhaitable d'effectuer d'autres études sur l'action de F2 sur le passage des xénobiotiques au travers de la barrière renforcée que peut constituer la couche de mucus intestinale. Enfin l'effet de ce promoteur d'absorption de médicaments devrait être testé sur la solubilisation d'autres médicaments.



## **PARTIE 6: Références bibliographiques**

# Références

1. Altmann, G.G. and M. Enesco, *Cell number as a measure of distribution and renewal of epithelial cells in the small intestine of growing and adult rats*. Am J Anat, 1967. 121(2): p. 319-36.
2. Cheng, K.J., R.P. McCowan, and J.W. Costerton, *Adherent epithelial bacteria in ruminants and their roles in digestive tract function*. Am J Clin Nutr, 1979. 32(1): p. 139-48.
3. Tortora, G.J. and S.R. Grabowski, *Principe d'anatomie et de physiologie*, ed. D.B. Université. 1994.
4. Kovbasnjuk, O.N. and K.R. Spring, *The apical membrane glycocalyx of MDCK cells*. J Membr Biol, 2000. 176(1): p. 19-29.
5. Pappenheimer, J.R., *Role of pre-epithelial "unstirred" layers in absorption of nutrients from the human jejunum*. J Membr Biol, 2001. 179(3): p. 185-204.
6. Porchet, N. and J.P. Aubert, *[MUC genes: mucin or not mucin? That is the question]*. Med Sci (Paris), 2004. 20(5): p. 569-74.
7. Kraehenbuhl, J.P., et al., *Antigen sampling by epithelial tissues: implication for vaccine design*. Behring Inst Mitt, 1997(98): p. 24-32.
8. Tomasetto, C., et al., *pS2/TFF1 interacts directly with the VWFC cysteine-rich domains of mucins*. Gastroenterology, 2000. 118(1): p. 70-80.
9. Ruchaud-Sparagano, M.H., B.R. Westley, and F.E. May, *The trefoil protein TFF1 is bound to MUC5AC in human gastric mucosa*. Cell Mol Life Sci, 2004. 61(15): p. 1946-54.
10. Johansson, M.E., J.M. Larsson, and G.C. Hansson, *The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. 108 Suppl 1: p. 4659-65.
11. Cheng, H. and C.P. Leblond, *Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types*. Am J Anat, 1974. 141(4): p. 537-61.
12. Cummings, D.E. and J. Overduin, *Gastrointestinal regulation of food intake*. J Clin Invest, 2007. 117(1): p. 13-23.
13. Engelstoft, M.S., et al., *A gut feeling for obesity : 7TM sensors on enteroendocrine cells*. Cell Metab, 2008. 8(6): p. 447-449.
14. Akiba, Y. and J.D. Kaunitz, *Duodenal chemosensing and mucosal defenses*. Digestion, 2011. 83 Suppl 1: p. 25-31.
15. Bry, L., et al., *Paneth cell differentiation in the developing intestine of normal and transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(22): p. 10335-9.

16. Clevers, H., *The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment*. Cell, 2013. 154(2): p. 274-84.
17. Erlandsen, S.L., J.A. Parsons, and T.D. Taylor, *Ultrastructural immunocytochemical localization of lysozyme in the Paneth cells of man*. J Histochem Cytochem, 1974. 22(6): p. 401-13.
18. Stappenbeck, T.S., *Paneth cell development, differentiation, and function: new molecular cues*. Gastroenterology, 2009. 137(1): p. 30-3.
19. Ouellette, A.J. and C.L. Bevins, *Paneth cell defensins and innate immunity of the small bowel*. Inflamm Bowel Dis, 2001. 7(1): p. 43-50.
20. Cunliffe, R.N. and Y.R. Mahida, *Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract*. J Leukoc Biol, 2004. 75(1): p. 49-58.
21. Crosnier, C., D. Stamataki, and J. Lewis, *Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control*. Nat Rev Genet, 2006. 7(5): p. 349-59.
22. Potten, C.S., et al., *Circadian rhythms of presumptive stem cells in three different epithelia of the mouse*. Cell Tissue Kinet, 1977. 10(6): p. 557-68.
23. Hall, P.A., et al., *Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis*. J Cell Sci, 1994. 107 ( Pt 12): p. 3569-77.
24. Ramiro-Puig, E., et al., *[The bowel: a key component of the immune system]*. Rev Esp Enferm Dig, 2008. 100(1): p. 29-34.
25. Johansson, C. and B.L. Kelsall, *Phenotype and function of intestinal dendritic cells*. Semin Immunol, 2005. 17(4): p. 284-94.
26. Diebold, S.S., et al., *Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers*. Nature, 2003. 424(6946): p. 324-8.
27. Stagg, A.J., et al., *The dendritic cell: its role in intestinal inflammation and relationship with gut bacteria*. Gut, 2003. 52(10): p. 1522-9.
28. Said, H.M., R. Redha, and W. Nylander, *A carrier-mediated, Na<sup>+</sup> gradient-dependent transport for biotin in human intestinal brush-border membrane vesicles*. Am J Physiol, 1987. 253(5 Pt 1): p. G631-6.
29. Hidalgo, I.J. and J.B. Li, *Carrier-mediated transport and efflux mechanism in CaCo-2 cells*. Advan Drug Delivery Rev 1996. 22: p. 53-66.
30. Farquhar, M.G. and G.E. Palade, *Junctional complexes in various epithelia*. J Cell Biol, 1963. 17: p. 375-412.
31. Ito, S., *Form and function of the glycocalyx on free cell surfaces*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1974. 268(891): p. 55-66.
32. Massey-Harroche, D., *Epithelial cell polarity as reflected in enterocytes*. Microsc Res Tech, 2000. 49(4): p. 353-62.

33. Didier, A. and F. Jourdan, *The Ginkgo biloba extract modulates the balance between proliferation and differentiation in the olfactory epithelium of adult mice following bullectomy*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2002. 48(6): p. 717-23.
34. Clark, M.A. and M.A. Jepson, *Intestinal M cells and their role in bacterial infection*. Int J Med Microbiol, 2003. 293(1): p. 17-39.
35. Joyce, G.F. and T. Inoue, *Structure of the catalytic core of the Tetrahymena ribozyme as indicated by reactive abbreviated forms of the molecule*. Nucleic Acids Res, 1987. 15(23): p. 9825-40.
36. Sugano, K., *Aqueous boundary layers related to oral absorption of a drug: from dissolution of a drug to carrier mediated transport and intestinal wall metabolism*. Mol Pharm, 2010. 7(5): p. 1362-73.
37. Atuma, C., et al., *The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. 280(5): p. G922-9.
38. Johansson, M.E., et al., *The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(39): p. 15064-9.
39. Wolf, D.P., et al., *Human cervical mucus. III. Isolation and characterization of rheologically active mucin*. Fertil Steril, 1977. 28(1): p. 53-8.
40. Strugala, V., et al., *Colonic mucin: methods of measuring mucus thickness*. Proc Nutr Soc, 2003. 62(1): p. 237-43.
41. Gouyer, V., F. Gottrand, and J.L. Desseyn, *The extraordinarily complex but highly structured organization of intestinal mucus-gel unveiled in multicolor images*. PLoS One, 2011. 6(4): p. e18761.
42. Iiboshi, Y., et al., *Developmental changes in distribution of the mucous gel layer and intestinal permeability in rat small intestine*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1996. 20(6): p. 406-11.
43. Hollander, D., et al., *Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor*. Ann Intern Med, 1986. 105(6): p. 883-5.
44. Teahon, K., et al., *Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their first degree relatives*. Gut, 1992. 33(3): p. 320-3.
45. Smith, P.L., et al., *Routes of delivery. case studies (5): oral absorption of peptides and proteins*. Adv Drug Deliv Rev 1992. 8: p. 253-290.
46. Thorens, B., *Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal, and liver glucose fluxes*. Am J Physiol, 1996. 270(4 Pt 1): p. G541-53.
47. Nellans, H.N., *paracellular intestinal transport: modulation of absorption*. Adv Drug Deliv Rev 1991. 7: p. 339-364.

48. Xantheas, S.S. and G.A. Voth, *Aqueous solutions and their interfaces*. J Phys Chem B, 2009. 113(13): p. 3997-9.
49. Winkler, R.G., et al., *Hydration of beta-cyclodextrin: a molecular dynamics simulation study*. J Comput Aided Mol Des, 2000. 14(7): p. 659-67.
50. Gun'ko, V.M., et al., *Unusual properties of water at hydrophilic/hydrophobic interfaces*. Adv Colloid Interface Sci, 2005. 118(1-3): p. 125-72.
51. Disalvo, E.A., F. Lairion, and F. Martini, *Water in biological membrane at interfaces :does it play a functional role?* J Argent Chem Soc., 2004. 92: p. 1-22.
52. Lennernas, H., *Human intestinal permeability*. J Pharm Sci, 1998. 87(4): p. 403-10.
53. Karlsson, N.G., et al., *The glycosylation of rat intestinal Muc2 mucin varies between rat strains and the small and large intestine. A study of O-linked oligosaccharides by a mass spectrometric approach*. J Biol Chem, 1997. 272(43): p. 27025-34.
54. Brewster, M.E., et al., *Effect of the unstirred water layer on permeability enhancement by hydrophilic cyclodextrins*. Int J Pharm, 2007. 342(1-2): p. 250-3.
55. Loftsson, T., et al., *Effects of cyclodextrins on drug delivery through biological membranes*. J Pharm Sci, 2007. 96(10): p. 2532-46.
56. Sugano, K., *Theoretical investigation of passive intestinal membrane permeability using Monte Carlo method to generate drug-like molecule population*. Int J Pharm, 2009. 373(1-2): p. 55-61.
57. Khanvilkar, K., M.D. Donovan, and D.R. Flanagan, *Drug transfer through mucus*. Adv Drug Deliv Rev, 2001. 48(2-3): p. 173-93.
58. Allen, A., et al., *Studies on gastrointestinal mucus*. Scand J Gastroenterol Suppl, 1984. 93: p. 101-13.
59. Rathbone, M.J. and J. Hadgraft, *Absorption of drugs from the human oral cavity*. Int J Pharm 1991. 74: p. 9-24.
60. Meslin, J.C., et al., *Effects of galacto-oligosaccharide and bacterial status on mucin distribution in mucosa and on large intestine fermentation in rats*. Br J Nutr, 1993. 69(3): p. 903-12.
61. Lichtenberger, L.M., *The hydrophobic barrier properties of gastrointestinal mucus*. Annu Rev Physiol, 1995. 57: p. 565-83.
62. Slomiany, A., et al., *Lipid composition of the gastric mucous barrier in the rat*. J Biol Chem, 1978. 253(11): p. 3785-91.
63. Braun, A., et al., *Alterations of phospholipid concentration and species composition of the intestinal mucus barrier in ulcerative colitis: a clue to pathogenesis*. Inflamm Bowel Dis, 2009. 15(11): p. 1705-20.

64. Butler, B.D., L.M. Lichtenberger, and B.A. Hills, *Distribution of surfactants in the canine gastrointestinal tract and their ability to lubricate*. Am J Physiol, 1983. 244(6): p. G645-51.
65. Okuyama, H., et al., *Changes, with age, in the phospholipid content of the intestinal mucus layer of the newborn rabbit*. J Pediatr Surg, 1998. 33(1): p. 35-8.
66. Johansson, M.E., K.A. Thomsson, and G.C. Hansson, *Proteomic analyses of the two mucus layers of the colon barrier reveal that their main component, the Muc2 mucin, is strongly bound to the Fcgbp protein*. J Proteome Res, 2009. 8(7): p. 3549-57.
67. Albert, T.K., et al., *Human intestinal TFF3 forms disulfide-linked heteromers with the mucus-associated FCGBP protein and is released by hydrogen sulfide*. J Proteome Res, 2010. 9(6): p. 3108-17.
68. Taupin, D. and D.K. Podolsky, *Trefoil factors: initiators of mucosal healing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. 4(9): p. 721-32.
69. Poulsen, S.S., et al., *Luminal and parenteral TFF2 and TFF3 dimer and monomer in two models of experimental colitis in the rat*. Regul Pept, 2005. 126(3): p. 163-71.
70. Podolsky, D.K., et al., *Colitis-associated variant of TLR2 causes impaired mucosal repair because of TFF3 deficiency*. Gastroenterology, 2009. 137(1): p. 209-20.
71. Hogan, S.P., et al., *Resistin-like molecule beta regulates innate colonic function: barrier integrity and inflammation susceptibility*. J Allergy Clin Immunol, 2006. 118(1): p. 257-68.
72. Nair, M.G., et al., *Goblet cell-derived resistin-like molecule beta augments CD4+ T cell production of IFN-gamma and infection-induced intestinal inflammation*. J Immunol, 2008. 181(7): p. 4709-15.
73. Kim, Y.S. and S.B. Ho, *Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress*. Curr Gastroenterol Rep, 2010. 12(5): p. 319-30.
74. Thornton, D.J., K. Rousseau, and M.A. McGuckin, *Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus*. Annu Rev Physiol, 2008. 70: p. 459-86.
75. Rose, M.C. and J.A. Voynow, *Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease*. Physiol Rev, 2006. 86(1): p. 245-78.
76. Moniaux, N., et al., *Structural organization and classification of the human mucin genes*. Front Biosci, 2001. 6: p. D1192-206.
77. Linden, S.K., et al., *Mucins in the mucosal barrier to infection*. Mucosal Immunol, 2008. 1(3): p. 183-97.
78. Pigny, P., et al., *Human mucin genes assigned to 11p15.5: identification and organization of a cluster of genes*. Genomics, 1996. 38(3): p. 340-52.

79. Voynow, J.A. and B.K. Rubin, *Mucins, mucus, and sputum*. Chest, 2009. 135(2): p. 505-12.
80. Cone, R.A., *Barrier properties of mucus*. Adv Drug Deliv Rev, 2009. 61(2): p. 75-85.
81. Bhushana-Rao, K.S. and P.L. Masson, *A tentative model for the structure of bovine oestrus cervical*. Adv Exp Med Biol, 1977. 89: p. 275-82.
82. Verdugo, P., P.Y. Tam, and J. Butler, *Conformational structure of respiratory mucus studied by laser correlation spectroscopy*. Biorheology, 1983. 20(2): p. 223-30.
83. McGuckin, M.A., et al., *Mucin dynamics and enteric pathogens*. Nat Rev Microbiol, 2010. 9(4): p. 265-78.
84. Ambort, D., et al., *Calcium and pH-dependent packing and release of the gel-forming MUC2 mucin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. 109(15): p. 5645-50.
85. Godl, K., et al., *The N terminus of the MUC2 mucin forms trimers that are held together within a trypsin-resistant core fragment*. J Biol Chem, 2002. 277(49): p. 47248-56.
86. Schulz, B.L., et al., *Mucin glycosylation changes in cystic fibrosis lung disease are not manifest in submucosal gland secretions*. Biochem J, 2005. 387(Pt 3): p. 911-9.
87. Thai, P., et al., *Regulation of airway mucin gene expression*. Annu Rev Physiol, 2008. 70: p. 405-29.
88. Derrien, M., et al., *Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract*. Gut Microbes, 2010. 1(4): p. 254-268.
89. Verdugo, P., *Supramolecular dynamics of mucus*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. 2(11).
90. Varum, F.J., et al., *An investigation into the role of mucus thickness on mucoadhesion in the gastrointestinal tract of pig*. Eur J Pharm Sci, 2010. 40(4): p. 335-41.
91. van Klinken, B.J., et al., *The oligomerization of a family of four genetically clustered human gastrointestinal mucins*. Glycobiology, 1998. 8(1): p. 67-75.
92. Maury, J., et al., *The filamentous brush border glycocalyx, a mucin-like marker of enterocyte hyper-polarization*. Eur J Biochem, 1995. 228(2): p. 323-31.
93. Thomson, A.B. and J.M. Dietschy, *Derivation of the equations that describe the effects of unstirred water layers on the kinetic parameters of active transport processes in the intestine*. J Theor Biol, 1977. 64(2): p. 277-94.
94. Buisine, M.P., et al., *Mucin gene expression in intestinal epithelial cells in Crohn's disease*. Gut, 2001. 49(4): p. 544-51.

95. Van Klinken, B.J., et al., *Mucin gene structure and expression: protection vs. adhesion*. Am J Physiol, 1995. 269(5 Pt 1): p. G613-27.
96. Vermeer, P.D., et al., *Segregation of receptor and ligand regulates activation of epithelial growth factor receptor*. Nature, 2003. 422(6929): p. 322-6.
97. Kufe, D.W., *Mucins in cancer: function, prognosis and therapy*. Nat Rev Cancer, 2009. 9(12): p. 874-85.
98. Johansson, M.E., et al., *Bacteria penetrate the inner mucus layer before inflammation in the dextran sulfate colitis model*. PLoS One, 2010. 5(8): p. e12238.
99. Velcich, A., et al., *Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2*. Science, 2002. 295(5560): p. 1726-9.
100. Van der Sluis, M., et al., *Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection*. Gastroenterology, 2006. 131(1): p. 117-29.
101. Bell, A.E., et al., *Properties of gastric and duodenal mucus: effect of proteolysis, disulfide reduction, bile, acid, ethanol, and hypertonicity on mucus gel structure*. Gastroenterology, 1985. 88(1 Pt 2): p. 269-80.
102. Ensign, L.M., R. Cone, and J. Hanes, *Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: the gastrointestinal mucus barriers*. Adv Drug Deliv Rev, 2012. 64(6): p. 557-70.
103. Puisieux, F., et al., *[Swallowing disorders, pneumonia and respiratory tract infectious disease in the elderly]*. Rev Mal Respir, 2009. 26(6): p. 587-605.
104. Gouyer, V., et al., *Differential effect of GalNAc $\alpha$ -O-bn on intracellular trafficking in enterocytic HT-29 and Caco-2 cells: correlation with the glycosyltransferase expression pattern*. J Cell Sci, 2001. 114(Pt 8): p. 1455-71.
105. Sun, B.W., et al., *Changes of biological functions of dipeptide transporter (PepT1) and hormonal regulation in severe scald rats*. World J Gastroenterol, 2003. 9(12): p. 2782-5.
106. Clancey, C.J. and J.E. Lever, *Differential regulation of three glucose transporter genes in a renal epithelial cell line*. J Cell Physiol, 2000. 185(2): p. 244-52.
107. Tamai, I., et al., *Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2*. J Biol Chem, 1998. 273(32): p. 20378-82.
108. Tamai, I., et al., *Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. 273(1): p. 251-60.
109. Thelin, W.R., C.A. Hodson, and S.L. Milgram, *Beyond the brush border: NHERF4 blazes new NHERF turf*. J Physiol, 2005. 567(Pt 1): p. 13-9.



110. Ward, P.D., T.K. Tippin, and D.R. Thakker, *Enhancing paracellular permeability by modulating epithelial tight junctions*. Pharm Sci Technol Today, 2000. 3(10): p. 346-358.
111. Arrieta, M.C., L. Bistriz, and J.B. Meddings, *Alterations in intestinal permeability*. Gut, 2006. 55(10): p. 1512-20.
112. Salamat-Miller, N. and T.P. Johnston, *Current strategies used to enhance the paracellular transport of therapeutic polypeptides across the intestinal epithelium*. Int J Pharm, 2005. 294(1-2): p. 201-16.
113. Salama, N.N., N.D. Eddington, and A. Fasano, *Tight junction modulation and its relationship to drug delivery*. Adv Drug Deliv Rev, 2006. 58(1): p. 15-28.
114. Fasano, A., *Modulation of intestinal permeability: an innovative method of oral drug delivery for the treatment of inherited and acquired human diseases*. Mol Genet Metab, 1998. 64(1): p. 12-8.
115. Fasano, A., *Novel approaches for oral delivery of macromolecules*. J Pharm Sci, 1998. 87(11): p. 1351-6.
116. Pappenheimer, J.R., *Physiological regulation of transepithelial impedance in the intestinal mucosa of rats and hamsters*. J Membr Biol, 1987. 100(2): p. 137-48.
117. Suzuki, T., *Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions*. Cell Mol Life Sci, 2013. 70(4): p. 631-59.
118. Ebnet, K., *Organization of multiprotein complexes at cell-cell junctions*. Histochem Cell Biol, 2008. 130(1): p. 1-20.
119. Lampe, P.D., et al., *Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication*. J Cell Biol, 2000. 149(7): p. 1503-12.
120. Lampe, P.D. and A.F. Lau, *The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. 36(7): p. 1171-86.
121. Kaminsky, L.S. and Q.Y. Zhang, *The small intestine as a xenobiotic-metabolizing organ*. Drug Metab Dispos, 2003. 31(12): p. 1520-5.
122. Wacher, V.J., L. Salphati, and L.Z. Benet, *Active secretion and enterocytic drug metabolism barriers to drug absorption*. Adv Drug Deliv Rev, 2001. 46(1-3): p. 89-102.
123. Kolars, J.C., et al., *CYP3A gene expression in human gut epithelium*. Pharmacogenetics, 1994. 4(5): p. 247-59.
124. Strugnell, R.A. and O.L. Wijburg, *The role of secretory antibodies in infection immunity*. Nat Rev Microbiol, 2010. 8(9): p. 656-67.
125. Barthe, L., J. Woodley, and G. Houin, *Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies*. Fundam Clin Pharmacol, 1999. 13(2): p. 154-68.

126. Thiebaut, F., et al., *Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. 84(21): p. 7735-8.
127. Pham, Y.T. and F. Giménez, *Capture, efflux et modulation de transport des médicaments au niveau cérébral*. Journal de pharmacie clinique, 2001. 20(1): p. 52-63.
128. Varma, M.V., et al., *P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement*. Pharmacol Res, 2003. 48(4): p. 347-59.
129. Chan, L.M., S. Lowes, and B.H. Hirst, *The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability*. Eur J Pharm Sci, 2004. 21(1): p. 25-51.
130. Takano, M., R. Yumoto, and T. Murakami, *Expression and function of efflux drug transporters in the intestine*. Pharmacol Ther, 2006. 109(1-2): p. 137-61.
131. Higuchi, T., *Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from creams and ointments*. J Soc Cosmetic Chemists, 1960. 11: p. 85-97.
132. Buckley, S.T., et al., *In vitro models to evaluate the permeability of poorly soluble drug entities: challenges and perspectives*. Eur J Pharm Sci, 2012. 45(3): p. 235-50.
133. Kanzer, J., et al., *In-vitro permeability screening of melt extrudate formulations containing poorly water-soluble drug compounds using the phospholipid vesicle-based barrier*. J Pharm Pharmacol, 2010. 62(11): p. 1591-8.
134. Ginski, M.J., R. Taneja, and J.E. Polli, *Prediction of dissolution-absorption relationships from a continuous dissolution/Caco-2 system*. AAPS PharmSci, 1999. 1(2): p. E3.
135. Kobayashi, M., et al., *Development of a new system for prediction of drug absorption that takes into account drug dissolution and pH change in the gastro-intestinal tract*. Int J Pharm, 2001. 221(1-2): p. 87-94.
136. Motz, S.A., et al., *Permeability assessment for solid oral drug formulations based on Caco-2 monolayer in combination with a flow through dissolution cell*. Eur J Pharm Biopharm, 2007. 66(2): p. 286-95.
137. Katneni, K., S.A. Charman, and C.J. Porter, *Permeability assessment of poorly water-soluble compounds under solubilizing conditions: the reciprocal permeability approach*. J Pharm Sci, 2006. 95(10): p. 2170-85.
138. Katneni, K., S.A. Charman, and C.J. Porter, *Impact of cremophor-EL and polysorbate-80 on digoxin permeability across rat jejunum: delineation of thermodynamic and transporter related events using the reciprocal permeability approach*. J Pharm Sci, 2007. 96(2): p. 280-93.
139. Katneni, K., S.A. Charman, and C.J. Porter, *Use of plasma proteins as solubilizing agents in in vitro permeability experiments: correction for unbound drug concentration using the reciprocal permeability approach*. J Pharm Sci, 2008. 97(1): p. 209-24.

140. Katneni, K., S.A. Charman, and C.J. Porter, *An evaluation of the relative roles of the unstirred water layer and receptor sink in limiting the in-vitro intestinal permeability of drug compounds of varying lipophilicity*. J Pharm Pharmacol, 2008. 60(10): p. 1311-9.
141. Dahan, A., et al., *The solubility-permeability interplay in using cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers: mechanistic modeling and application to progesterone*. J Pharm Sci, 2010. 99(6): p. 2739-49.
142. Szentkuti, L. and K. Lorenz, *The thickness of the mucus layer in different segments of the rat intestine*. Histochem J, 1995. 27(6): p. 466-72.
143. Dulfer, W.J., J.P. Groten, and H.A. Govers, *Effect of fatty acids and the aqueous diffusion barrier on the uptake and transport of polychlorinated biphenyls in Caco-2 cells*. J Lipid Res, 1996. 37(5): p. 950-61.
144. Pohl, P., S.M. Saparov, and Y.N. Antonenko, *The size of the unstirred layer as a function of the solute diffusion coefficient*. Biophys J, 1998. 75(3): p. 1403-9.
145. Chen, E.Y., et al., *A new role for bicarbonate in mucus formation*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2010. 299(4): p. L542-9.
146. Garcia, M.A., N. Yang, and P.M. Quinton, *Normal mouse intestinal mucus release requires cystic fibrosis transmembrane regulator-dependent bicarbonate secretion*. J Clin Invest, 2009. 119(9): p. 2613-22.
147. Flaten, G.E., et al., *Drug permeability across a phospholipid vesicle-based barrier 4. The effect of tensides, co-solvents and pH changes on barrier integrity and on drug permeability*. Eur J Pharm Sci, 2008. 34(2-3): p. 173-80.
148. Cao, X., et al., *pH-dependent conformational change of gastric mucin leads to sol-gel transition*. Biophys J, 1999. 76(3): p. 1250-8.
149. Lai, S.K., et al., *Micro- and macrorheology of mucus*. Adv Drug Deliv Rev, 2009. 61(2): p. 86-100.
150. Thathiah, A., C.P. Blobel, and D.D. Carson, *Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM 17 mediates MUC1 shedding*. J Biol Chem, 2003. 278(5): p. 3386-94.
151. Thim, L., F. Madsen, and S.S. Poulsen, *Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels*. Eur J Clin Invest, 2002. 32(7): p. 519-27.
152. Matthews, L.W., et al., *Studies on Pulmonary Secretions. I. The over-All Chemical Composition of Pulmonary Secretions from Patients with Cystic Fibrosis, Bronchiectasis, and Laryngectomy*. Am Rev Respir Dis, 1963. 88: p. 199-204.
153. Potter, J.L., et al., *Studies on pulmonary secretions. II. Osmolality and the ionic environment of pulmonary secretions from patients with cystic fibrosis, bronchiectasis, and laryngectomy*. Am Rev Respir Dis, 1967. 96(1): p. 83-7.

154. Puchelle, E., et al., *Rheological and transport properties of airway secretions in cystic fibrosis--relationships with the degree of infection and severity of the disease*. Eur J Clin Invest, 1985. 15(6): p. 389-94.
155. Girod, S., et al., *Role of the physiochemical properties of mucus in the protection of the respiratory epithelium*. Eur Respir J, 1992. 5(4): p. 477-87.
156. Masaoka, Y., et al., *Site of drug absorption after oral administration: assessment of membrane permeability and luminal concentration of drugs in each segment of gastrointestinal tract*. Eur J Pharm Sci, 2006. 29(3-4): p. 240-50.
157. Meddings, J.B. and S. Theisen, *Development of rat jejunum: lipid permeability, physical properties, and chemical composition*. Am J Physiol, 1989. 256(5 Pt 1): p. G931-40.
158. Dudeja, P.K., et al., *Protein-lipid interactions in human small intestinal brush-border membranes*. Am J Physiol, 1989. 257(5 Pt 1): p. G809-17.
159. Ibrahim, S.A. and K.A. Balasubramanian, *Lipid composition and membrane fluidity of monkey small intestinal brush border membrane: regional differences*. Indian J Biochem Biophys, 1995. 32(5): p. 290-4.
160. Garriga, C., et al., *Regional differences in transport, lipid composition, and fluidity of apical membranes of small intestine of chicken*. Poult Sci, 2002. 81(4): p. 537-45.
161. Deli, M.A., *Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery*. Biochim Biophys Acta, 2009. 1788(4): p. 892-910.
162. Schipper, N.G., et al., *Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: mechanism of absorption enhancement*. Pharm Res, 1997. 14(7): p. 923-9.
163. Gao, Y., et al., *Improvement of intestinal absorption of insulin and water-soluble macromolecular compounds by chitosan oligomers in rats*. Int J Pharm, 2008. 359(1-2): p. 70-8.
164. An, G., et al., *Increased susceptibility to colitis and colorectal tumors in mice lacking core 3-derived O-glycans*. J Exp Med, 2007. 204(6): p. 1417-29.
165. Stone, E.L., et al., *Glycosyltransferase function in core 2-type protein O glycosylation*. Mol Cell Biol, 2009. 29(13): p. 3770-82.
166. Crooks, J., *Drug epidemiology and clinical pharmacology: their contribution to patient care*. Br J Clin Pharmacol, 1983. 16(4): p. 351-7.
167. Eto, B., *Research in clinical phytopharmacology to develop health care in developing countries: State of the art and perspectives*. Phytopharmacology, 2013. 4(2): p. 149-205.
168. Izzo, A.A. and E. Ernst, *Interactions between herbal medicines and prescribed drugs: a systematic review*. Drugs, 2001. 61(15): p. 2163-75.

169. Barry, M., et al., *Pharmacokinetics and potential interactions amongst antiretroviral agents used to treat patients with HIV infection*. Clin Pharmacokinet, 1999. 36(4): p. 289-304.
170. Haas, D.W., et al., *Therapy with atazanavir plus saquinavir in patients failing highly active antiretroviral therapy: a randomized comparative pilot trial*. AIDS, 2003. 17(9): p. 1339-49.
171. Moyle, G.J. and D. Back, *Principles and practice of HIV-protease inhibitor pharmacoenhancement*. HIV Med, 2001. 2(2): p. 105-13.
172. Vogel, M., et al., *Management of drug-to-drug interactions between cyclosporine A and the protease-inhibitor lopinavir/ritonavir in liver-transplanted HIV-infected patients*. Liver Transpl, 2004. 10(7): p. 939-44.
173. Crommentuyn, K.M., et al., *Drug-drug interaction between itraconazole and the antiretroviral drug lopinavir/ritonavir in an HIV-1-infected patient with disseminated histoplasmosis*. Clin Infect Dis, 2004. 38(8): p. e73-5.
174. Acosta, E.P., et al., *Effect of concomitantly administered rifampin on the pharmacokinetics and safety of atazanavir administered twice daily*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. 51(9): p. 3104-10.
175. Tilburt, J.C. and T.J. Kaptchuk, *Herbal medicine research and global health: an ethical analysis*. Bull World Health Organ, 2008. 86(8): p. 594-9.
176. Schilter, B., et al., *Guidance for the safety assessment of botanicals and botanical preparations for use in food and food supplements*. Food Chem Toxicol, 2003. 41(12): p. 1625-49.
177. EMEA, *EMEA Committee on herbal medicinal products (HMPC). Guideline on the assessment of clinical safety and efficacy in the preparation of community herbal monographs for well-established and of community herbals monographs/entries to the community list for traditional herbal medicinal products/substances/ preparations*. 2006.
178. Hu, Z., et al., *Herb-drug interactions: a literature review*. Drugs, 2005. 65(9): p. 1239-82.
179. Colalto, C., *Herbal interactions on absorption of drugs: Mechanisms of action and clinical risk assessment*. Pharmacol Res, 2010. 62(3): p. 207-27.
180. Chen, X.W., et al., *Clinical herbal interactions with conventional drugs: from molecules to maladies*. Curr Med Chem, 2011. 18(31): p. 4836-50.
181. Eichmann, J., D.; A. Bakry Yassin, E.; and J. Robinson, R, *The influence of in vivo carbonation on GI physiological processes and drug permeability*. European J of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 1997. 44: p. 33-38.
182. Cuppoletti, J., et al., *SPI-0211 activates T84 cell chloride transport and recombinant human ClC-2 chloride currents*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. 287(5): p. C1173-83.

183. Fogh, J., J.M. Fogh, and T. Orfeo, *One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice*. J Natl Cancer Inst, 1977. 59(1): p. 221-6.
184. Polentarutti, B.I., et al., *Evaluation of viability of excised rat intestinal segments in the Ussing chamber: investigation of morphology, electrical parameters, and permeability characteristics*. Pharm Res, 1999. 16(3): p. 446-54.
185. Thiagarajah, J.R. and A.S. Verkman, *CFTR pharmacology and its role in intestinal fluid secretion*. Curr Opin Pharmacol, 2003. 3(6): p. 594-9.
186. Heinke, B., S. Horger, and M. Diener, *Mechanisms of carbachol-induced alterations in K<sup>+</sup> transport across the rat colon*. Eur J Pharmacol, 1998. 362(2-3): p. 199-206.
187. Dharmasathaphorn, K. and S.J. Pandol, *Mechanism of chloride secretion induced by carbachol in a colonic epithelial cell line*. J Clin Invest, 1986. 77(2): p. 348-54.
188. Tsai, J.C., S. Tsai, and W.C. Chang, *Effect of ethanol extracts of three Chinese medicinal plants with anti-diarrheal properties on ion transport of the rat intestinal epithelia*. J Pharmacol Sci, 2004. 94(1): p. 60-6.
189. McIsaac, W.J., P. Prakash, and S. Ross, *The management of acute uncomplicated cystitis in adult women by family physicians in Canada*. Can J Infect Dis Med Microbiol, 2008. 19(4): p. 287-93.
190. Kaplan, J.E., et al., *Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America*. MMWR Recomm Rep, 2009. 58(RR-4): p. 1-207; quiz CE1-4.
191. Pelissier, M.A., et al., *Metronidazole effects on microbiota and mucus layer thickness in the rat gut*. FEMS Microbiol Ecol, 2010. 73(3): p. 601-10.
192. Iiboshi, Y., et al., *Adhesive mucous gel layer and mucus release as intestinal barrier in rats*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1996. 20(2): p. 98-104.
193. Thomson, A.B. and J.M. Dietschy, *Intestinal kinetic parameters: effects of unstirred layers and transport preparation*. Am J Physiol, 1980. 239(5): p. G372-7.
194. Tai, Y.H. and C.Y. Tai, *The conventional short-circuiting technique under-short-circuits most epithelia*. J Membr Biol, 1981. 59(3): p. 173-7.
195. Chiou, W.L., *New perspectives on the theory of permeability and resistance in the study of drug transport and absorption*. J Pharmacokinet Biopharm, 1996. 24(4): p. 433-42.
196. Iiboshi, Y., et al., *Total parenteral nutrition decreases luminal mucous gel and increases permeability of small intestine*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1994. 18(4): p. 346-50.

197. Rebiere, H., et al., *Determination of 19 antiretroviral agents in pharmaceuticals or suspected products with two methods using high-performance liquid chromatography*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007. 850(1-2): p. 376-83.
198. Vertzoni, M., et al., *Degradation kinetics of metronidazole and olsalazine by bacteria in ascending colon and in feces of healthy adults*. Int J Pharm, 2011. 413(1-2): p. 81-6.
199. Cook, H.C., *A histochemical characterization of malignant tumour mucins as a possible aid in the identification of metastatic deposits*. Med Lab Technol, 1973. 30(3): p. 217-24.
200. Pelissier, M.A., et al., *Protection against dextran sodium sulfate-induced colitis by dehydroepiandrosterone and 7 $\alpha$ -hydroxy-dehydroepiandrosterone in the rat*. Steroids, 2006. 71(3): p. 240-8.
201. Mathieu, J., S. Mammar, and B. Eto, *Automated measurement of intestinal mucosa electrical parameters using a new digital clamp*. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 2008. 30(8): p. 591-8.
202. Desai, M.A., C.V. Nicholas, and P. Vadgama, *Electrochemical determination of the permeability of porcine mucus to model solute compounds*. J Pharm Pharmacol, 1991. 43(2): p. 124-7.
203. Korjamo, T., A.T. Heikkinen, and J. Monkkonen, *Analysis of unstirred water layer in in vitro permeability experiments*. J Pharm Sci, 2009. 98(12): p. 4469-79.
204. Dawson, D.C. and A.R. Cooke, *Parallel pathways for ion transport across rat gastric mucosa: effect of ethanol*. Am J Physiol, 1978. 235(1): p. E7-15.
205. Heyman, M., A.M. Dumontier, and J.F. Desjeux, *Xylose transport pathways in rabbit ileum*. Am J Physiol, 1980. 238(4): p. G326-31.
206. Ussing, H.H., *The active ion transport through the isolated frog skin in the light of tracer studies*. Acta Physiol Scand, 1949. 17(1): p. 1-37.
207. Varum, F.J., et al., *Mucus thickness in the gastrointestinal tract of laboratory animals*. J Pharm Pharmacol, 2011. 64(2): p. 218-27.
208. Zembruski, N.C., et al., *Potential of novel antiretrovirals to modulate expression and function of drug transporters in vitro*. J Antimicrob Chemother, 2011. 66(4): p. 802-12.
209. Rodriguez-Novoa, S., et al., *Overview of the pharmacogenetics of HIV therapy*. Pharmacogenomics J, 2006. 6(4): p. 234-45.
210. Perloff, M.D., et al., *Ritonavir induces P-glycoprotein expression, multidrug resistance-associated protein (MRP1) expression, and drug transporter-mediated activity in a human intestinal cell line*. J Pharm Sci, 2001. 90(11): p. 1829-37.

211. Kageyama, M., et al., *Effect of chronic administration of ritonavir on function of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein in rats*. Biol Pharm Bull, 2005. 28(1): p. 130-7.
212. Linden, S.K., T.H. Florin, and M.A. McGuckin, *Mucin dynamics in intestinal bacterial infection*. PLoS One, 2008. 3(12): p. e3952.
213. McGuckin, M.A., et al., *Mucin dynamics and enteric pathogens*. Nat Rev Microbiol, 2011. 9(4): p. 265-78.
214. Darmon, N., et al., *Oxidative stress may contribute to the intestinal dysfunction of weanling rats fed a low protein diet*. J Nutr, 1993. 123(6): p. 1068-75.
215. Sharma, R., et al., *Rat intestinal mucosal responses to a microbial flora and different diets*. Gut, 1995. 36(2): p. 209-14.
216. Sharma, R. and U. Schumacher, *Morphometric analysis of intestinal mucins under different dietary conditions and gut flora in rats*. Dig Dis Sci, 1995. 40(12): p. 2532-9.
217. Belkaid, Y. and J. Grainger, *Immunology. Mucus coat, a dress code for tolerance*. Science, 2013. 342(6157): p. 432-3.
218. Larsson, J.M., et al., *Altered O-glycosylation profile of MUC2 mucin occurs in active ulcerative colitis and is associated with increased inflammation*. Inflamm Bowel Dis, 2011. 17(11): p. 2299-307.
219. Heyman, M. and J.F. Desjeux, *Cytokine-induced alteration of the epithelial barrier to food antigens in disease*. Ann N Y Acad Sci, 2000. 915: p. 304-11.
220. Ota, H. and T. Katsuyama, *Alternating laminated array of two types of mucin in the human gastric surface mucous layer*. Histochem J, 1992. 24(2): p. 86-92.
221. Aungst, B.J., *Intestinal permeation enhancers*. J Pharm Sci, 2000. 89(4): p. 429-42.
222. Mokondjimobe, E., et al., *Fagaricine, a new immunorestorative phytomedicine from Zanthoxylum heitzii: Preclinical and multicenter cohort clinical studies based on HIV-infected patients in six countries*. Phytopharmacology, 2012. 2(1): p. 26-45.
223. Mamadou, G., et al., *Antispasmodic phytomedicine, from traditional utilization to rational formulation: functional approach*. Phytopharmacology, 2011. 1(3): p. 20-35.
224. Lu, Z., et al., *Effect of sinomenine on the in vitro intestinal epithelial transport of selected compounds*. Phytother Res, 2010. 24(2): p. 211-8.